



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**Corso di Laurea Magistrale in Farmacia**

**Tesi di Laurea**

**ATTIVITÀ DI UN RIBOZIMA ANTI-SURVIVINA SU  
CELLULE DI MELANOMA CUTANEO UMANO**

**Relatori**

Prof.ssa Paola Nieri

Dott.ssa Lorena Tedeschi

**Correlatore**

Dr.ssa Sara Carpi

**Candidato**

Leandro Olivelli

**ANNO ACCADEMICO 2014/2015**



# Indice

## **Capitolo I : Introduzione**

1.1	Survivina.....	5
1.1.1.	Funzioni della survivina.....	6
1.1.2.	Survivina e apoptosi.....	6
1.1.3.	Survivina e proliferazione cellulare.....	8
1.1.4.	Survivina e motilità cellulare.....	9
1.1.5.	Espressione e localizzazione subcellulare della survivina.....	9
1.1.6.	Survivina come target per la terapia anti-tumorale.....	10
1.1.7.	Approcci terapeutici diretti verso la survivina.....	11
1.2	Il Ribozima testa di martello (hammerhead).....	13
1.2.1	Utilizzo in terapia.....	16
1.3	Short-interfering RNA.....	17
1.4	Il melanoma cutaneo.....	18
1.4.1	Terapie del melanoma.....	19

## **Capitolo II: Scopo.....23**

## **Capitolo III: Materiali e metodi.....24**

3.1	Materiali per studi funzionali.....	24
3.2	Materiali per la trasfezione.....	26
3.3	Materiali per studi di biologia molecolare.....	28
3.4	Materiali per Western-blotting.....	29
3.5	Materiali per valutazione della vitalità cellulare.....	30
3.6	Metodi usati negli studi funzionali.....	31
3.6.1	Scongelamento linea cellulare.....	31
3.6.2	Mantenimento in coltura.....	31

3.6.3	Conta cellulare.....	32
3.6.4	Congelamento cellulare.....	33
3.7	Trasfezione con lipofectamina.....	33
3.8	Metodi usati negli studi di biologia molecolare.....	34
3.8.1	Estrazione dell'RNA totale.....	34
3.8.2	Retrotrascrizione.....	36
3.8.3	Realtime-PCR.....	37
3.9	Metodi usati per l'analisi tramite Western-blotting.....	38
3.9.1	Estrazione proteica.....	38
3.9.2	Quantizzazione proteica.....	38
3.9.3	Western-blotting.....	40
3.10	Metodi usati nello studio di vitalità cellulare.....	43
3.10.1	Rosso neutro.....	43
3.10.2	Valutazione della capacità di formazione delle colonie.....	44
3.11	Analisi dei dati.....	44
<b>Capitolo IV: Risultati e discussione.....</b>		<b>46</b>
<b>Capitolo V: Conclusioni.....</b>		<b>52</b>
<b>Bibliografia.....</b>		<b>53</b>
<b>Indice figure.....</b>		<b>60</b>
<b>Indice tabelle.....</b>		<b>62</b>

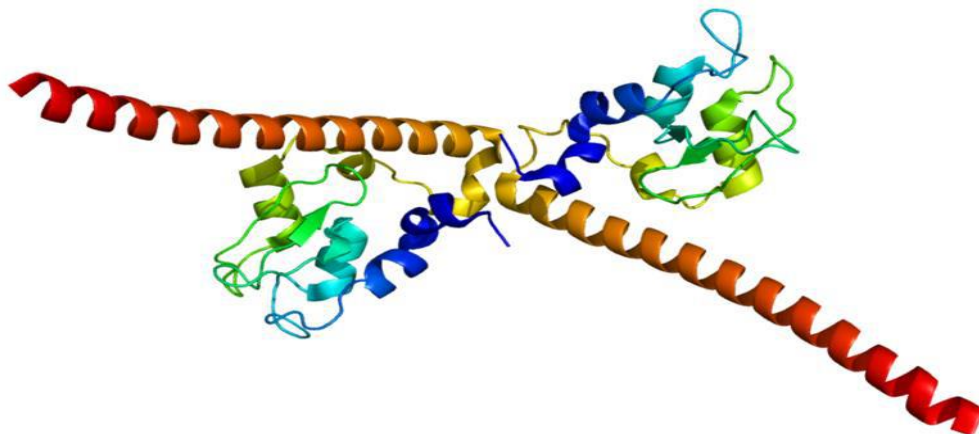
# Capitolo I

## Introduzione

### 1.1 Survivina

La survivina è una proteina che fa parte della famiglia delle proteine inibenti l'apoptosi (IAP proteins). Queste proteine, sono in grado di inibire le caspasi rendendo le cellule resistenti alla morte cellulare programmata.

La survivina (Fig 1), è una proteina di 16,5 kDa costituita da 142 amminoacidi e codificata da un gene localizzato sul cromosoma 17q25.



**Figura 1** Struttura tridimensionale della Survivina (RCSB protein databank, 2016)

Dal punto di vista strutturale, all'estremità ammino-terminale si trova una sola ripetizione del dominio *baculovirus IAP repeat* (BIR) essenziale per l'inibizione delle caspasi; all'estremità carbossi-terminale troviamo un' $\alpha$ -elica priva di domini ad anello che la differenziano dagli altri componenti della famiglia delle IAP.

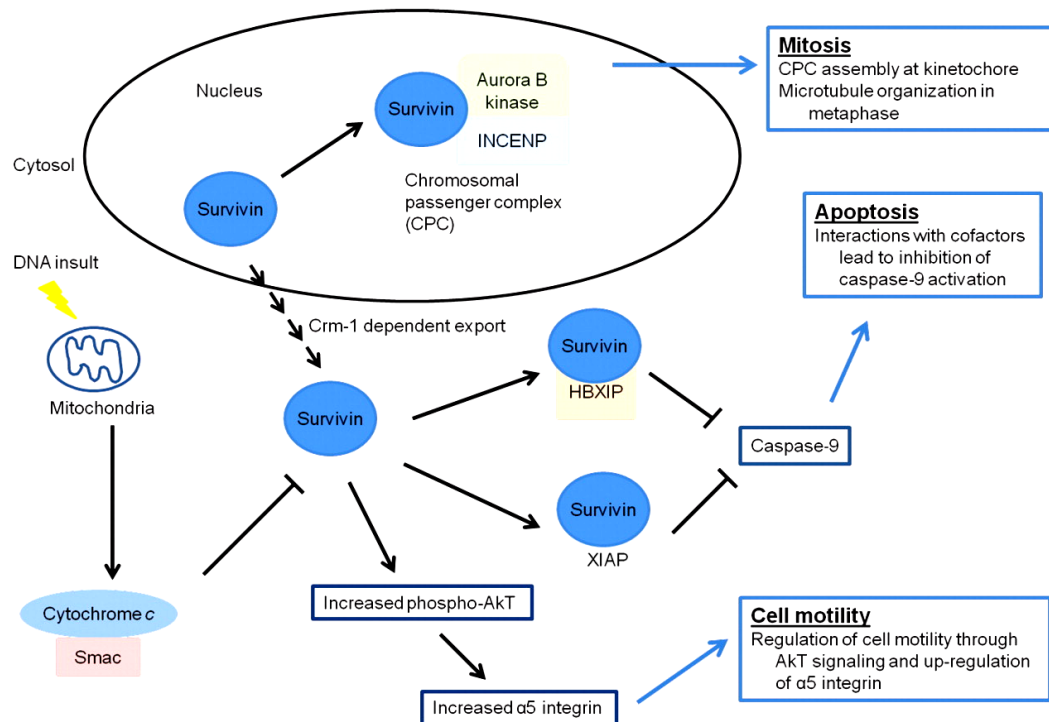
La biosintesi e il catabolismo della survivina nei tessuti sani dipendono dal ciclo cellulare. In particolare, la sua trascrizione avviene nella fase G1 per raggiungere un picco nella fase G2/M. La regolazione dell'espressione può avvenire a diversi livelli. In particolare, a livello trascrizionale, l'espressione è up-regolata sia dal fattore nucleare k-B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) che dal fattore di crescita insulino-simile I/mTOR (Insuline-like Growth Factor I/mTOR).

Altri fattori coinvolti nell'up-regolazione della survivina sono i membri della famiglia dell'oncogene Ras (*Rat sarcoma oncogene*) e il fattore antiapoptotico Wnt-2 (*Wingless-type MMTV integration site family, member 2*). La repressione dell'espressione del gene a livello trascrizionale avviene da parte del gene p53 (Mirza, et al., 2002).

La degradazione della survivina avviene attraverso la via ubiquitina-proteasoma durante la fase G1 del ciclo cellulare (Mita, et al., 2008).

### 1.1.1 Funzioni della Survivina

La survivina è una proteina multifunzionale coinvolta in diversi processi tra cui l'inibizione della morte cellulare per apoptosi, il controllo della divisione cellulare, la risposta allo stress, la regolazione della migrazione cellulare e l'angiogenesi (Singh, et al., 2015) (Fig.2).



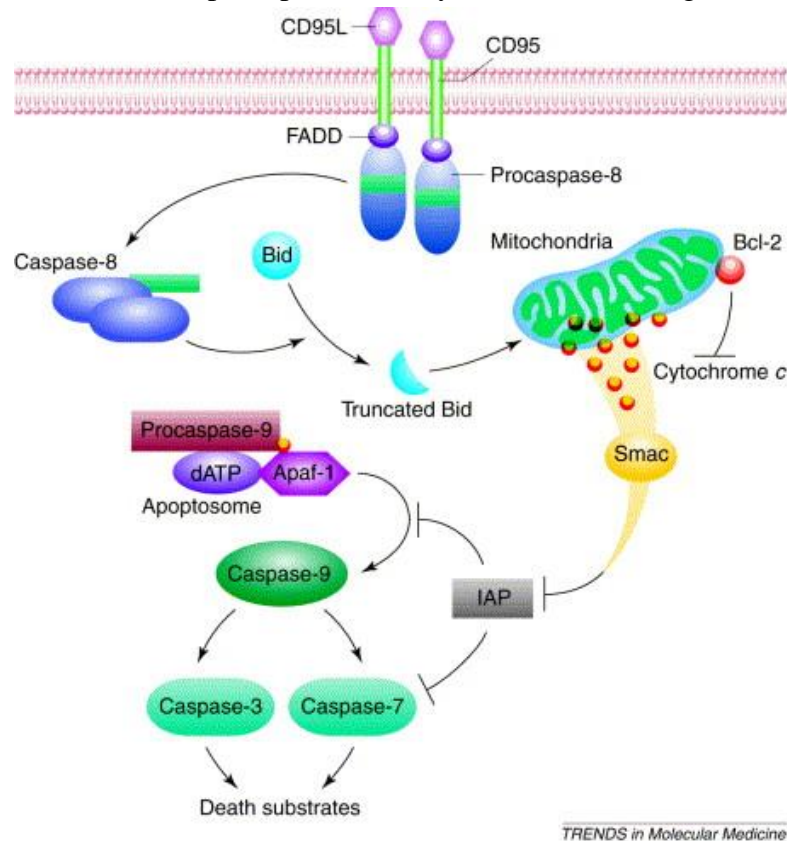
**Figura 2** Principali funzioni della Survivina (Grossman & Mckenzie, 2012)

### 1.1.2 Survivina e apoptosi

La capacità della survivina di inibire la morte cellulare è stata dimostrata, attraverso molteplici studi, sia *in vitro* che *in vivo*. Ad esempio, Altieri ha osservato *in vitro* che la survivina contrasta l'attività dei mediatori della via sia intrinseca che estrinseca dell'apoptosi come le caspasi 3, 7 e 8 (Altieri, 2010). Nonostante ciò, l'esatto meccanismo d'azione non è ancora del tutto noto (Ryan et al., 2009).

Le IAP legano direttamente le pro-caspasi impedendone la scissione proteolitica e quindi l'attivazione; la survivina, invece, non interagisce direttamente con il suo bersaglio ma va a legare la proteina XIAP (*X-linked IAP*) in risposta a stimoli estrinseci o intrinseci, stabilizzandola. La XIAP stabilizzata, lega la forma attiva della caspasi-9 inibendola e portando così ad un effetto anti-apoptotico. Un'altra via di inattivazione della caspasi-9, prevede il legame della survivina con il cofattore *Hepatitis B X interacting protein* (HBXIP) (Grossman & McKenzie, 2012). Un'ulteriore via di inibizione dell'apoptosi, riguarda l'interazione della survivina con il secondo attivatore mitocondriale delle caspasi Smac/DIABLO

(second mitochondrial-derived activator of caspasi/direct IAP-binding protein with low pI), che diviene incapace di bloccare l'attività delle altre IAP le quali vanno ad inibire le caspasi specifiche (Ryan et al., 2009) (Fig.3).



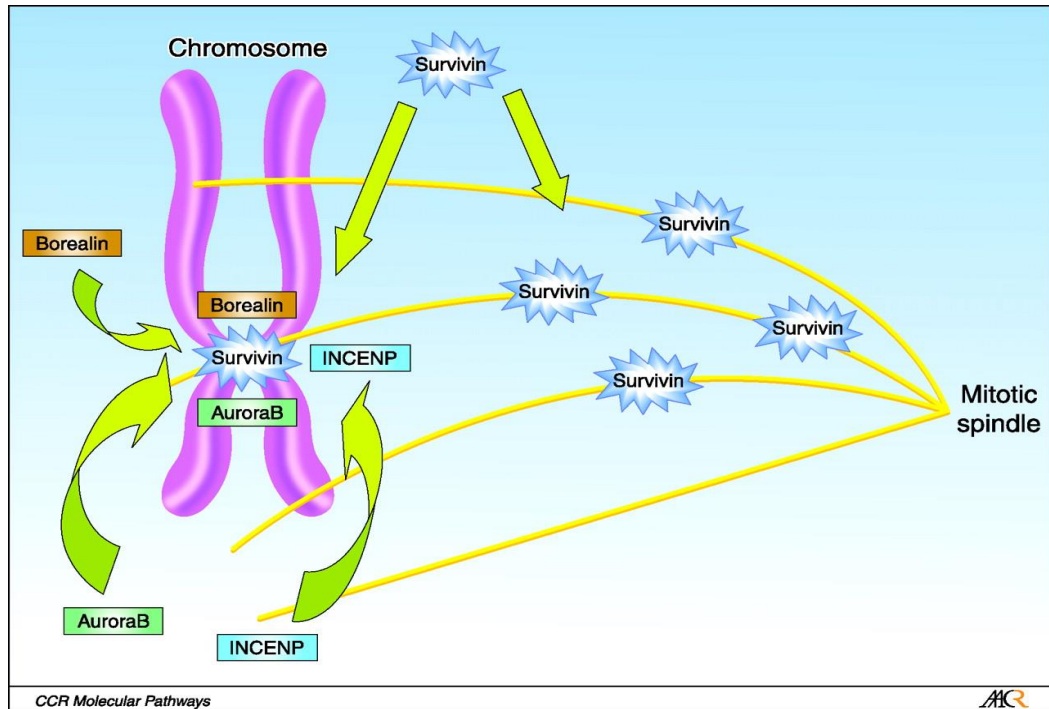
**Figura 3** Modulazione dell'apoptosi da parte delle IAP (Altieri , 2001)

La funzione anti-apoptotica della survivina è regolata negativamente da diversi fattori:

- La fosforilazione della Ser20 della proteina da parte della proteina chinasi A porta ad una mancata formazione del complesso XIAP-survivina bloccando così l'attività della survivina.
- Il rilascio da parte del mitocondrio della proteina Smac, in seguito all'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi, va a bloccare le IAP, tra cui anche la survivina,, portando al blocco dell'apoptosi (Grossman & McKenzie, 2012)
- La fosforilazione della Thr34 della survivina ad opera della chinasi mitotica p34/ciclina B1 è importante per mantenere le proprietà anti-apoptotiche. Studi hanno evidenziato che la sostituzione di tale amminoacido con l'alanina, porta ad inibizione dell' attività anti-apoptotica sia *in vivo* che *in vitro* (Altieri, 2001).

### 1.1.3 Survivina e proliferazione cellulare

La survivina gioca un ruolo centrale nel processo della divisione cellulare (Mita et al., 2008). I livelli di survivina aumentano durante la fase G1 e raggiungono un picco durante la fase G2/M; durante la mitosi, la survivina regola il corretto orientamento dei microtubuli (Fig.4) e funziona come parte del complesso passeggero cromosomiale (CPC) (Altieri, 2006)



**Figura 4** Funzione della survivina nel processo mitotico (Mita et al., 2008).

Il CPC ha il compito di correggere gli errori di “attacco” tra i cromosomi e il fuso mitotico e di garantire un’adeguata segregazione cromosomiale. Praticamente, la survivina promuove la proliferazione cellulare, facilitando la segregazione dei cromatidi e la formazione del fuso mitotico (Altieri, 2006). La survivina è anche localizzata nella porzione centromerica dei cromosomi metafasici dove è associata con l’Aurora B chinasi, la *Inner centromere protein* (INCENP) e la Borealina (Gassman et al., 2004). Ciò supporta l’ipotesi che la survivina agisca come una subunità del CPC e, se essa viene tolta dal processo, il sistema microtubulare non si forma, la divisione cellulare è incompleta e si va incontro a morte cellulare. Oltre che all’interno del CPC, la survivina si trova in parte legata ai microtubuli durante la mitosi; attraverso l’associazione con la chinasi-1 ciclina-dipendente (CDK1), questo legame viene fosforilato a livello della Thr34 comandando la stabilizzazione della proteina e l’attivazione di meccanismi anti-apoptotici durante il ciclo cellulare (Altieri, 2008).



#### **1.1.4 Survivina e motilità cellulare**

La motilità cellulare comprende sia la migrazione che l'invasione dei tessuti che sono aspetti fondamentali del processo metastatico (Hanahan and Weinberg, 2000). E' stato dimostrato che la survivina, legando cooperativamente la proteina XIAP, media il fenomeno d'invasione delle cellule, indipendentemente dalla funzione anti-apoptotica. Nello specifico, l'invasione survivina-mediata è indipendente dall'integrina (una glicoproteina integrale di membrana che svolge un ruolo nel collegamento tra la matrice extracellulare e la trasduzione intracellulare del segnale), mentre richiede l'attivazione del fattore nucleare di trascrizione  $\kappa$ -B, delle chinasi di adesione focale (FAK) e delle chinasi Src (Sarcoma di Rous tirosin chinasi) (Mehrotra et al., 2010). L'aumento della motilità è stato osservato anche su cellule di melanoma dove è risultato essere dipendente dall'attivazione della proteina chinasi B e dall' up-regolazione della  $\alpha 5$  integrina (Grossmann & McKenzie, 2012)

#### **1.1.5 Espressione e localizzazione subcellulare della survivina**

La survivina è espressa in modo ubiquitario a livello dei tessuti fetali sani (Adida, et al., 1998) mentre è poco espressa o assente nei tessuti adulti differenziati ad eccezione del timo, nelle cellule basali dell'epitelio del colon e nelle cellule staminali ematopoietiche CD34+ (Kelly et al., 2011). La survivina risulta espressa in molti tipi di tumori (Tab 1).

Le funzioni della survivina sono legate alla sua localizzazione intracellulare che può essere a tre livelli: citosolico, mitocondriale e nucleare. A livello nucleare la survivina, gioca un ruolo fondamentale nel processo mitotico mentre, a livello citosolico e mitocondriale, è responsabile della funzione anti-apoptotica (Dohi, et al., 2004).

Il trasporto della survivina all'esterno del nucleo, è attuato da un apposito vettore, l'esportina-1, sotto il controllo di uno specifico segnale di esportazione nucleare (NES). Se si hanno mutazioni a livello del NES, la survivina rimane intrappolata nel nucleo compromettendone sia l'azione sul ciclo cellulare che sugli enzimi pro-apoptotici (Knauer, et al., 2007).

Nelle cellule tumorali, la survivina, è espressa a livello dei mitocondri e, in risposta ai segnali apoptotici viene liberata nel citosol dove inibisce l'apoptosi (Dohi, Xia, Altieri, 2007).

Cancer	Expression (%)
Lung cancer	85.5% [76]
Esophageal cancer	80% [128]
Breast cancer	70.7% - 90.2% [33, 129]
Pancreatic cancer	76.9% - 88% [130, 131]
Ovarian cancer	73.5% [132]
Malignant melanoma	67% [67]
Colorectal cancer	63.5% [40]
Hepatocellular cancer	41%-87% [133, 134]
Gastric cancer	34.5% - 68% [37, 135]
Bladder cancer	57.8% [136]
Acute myeloid leukemia	54.8% [137]
Acute lymphocytic leukemia	68.8% [137]

**Tabella 1** Livelli di espressione della proteina survivina in tessuti tumorali (Kelly et al., 2011)

### 1.1.6 Survivina come target per la terapia anti-tumorale

La survivina possiede caratteristiche promettenti come potenziale bersaglio per il trattamento del cancro. Tra queste caratteristiche troviamo:

- Bassa espressione nelle cellule dei tessuti sani ed elevata espressione nelle cellule tumorali: questo è dovuto ad un' up-regolazione della trascrizione genica prodotta da proteine tumore-associate come c-myc (cromosoma 8 mielocitomatosi) e STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*). Inoltre, la survivina è coinvolta in numerosi meccanismi che portano al mantenimento del tumore: promuove la proliferazione cellulare e conferisce resistenza alla morte cellulare.
- La survivina risulta coinvolta nei processi di angiogenesi e crescita tumorale: l'angiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni ed è essenziale per la crescita del tumore. La survivina, in questo caso, gioca un ruolo determinante in quanto va ad inibire la morte delle cellule endoteliali promuovendo la sopravvivenza cellulare e la crescita del tumore. Conseguentemente, farmaci che vadano ad agire inibendo l'azione della survivina potrebbero andare a promuovere la morte delle cellule tumorali e a bloccare l'angiogenesi.
- La survivina risulta coinvolta nella resistenza a molteplici tipi di terapie anti-tumorale: la capacità della survivina di determinare resistenza alla morte cellulare è una delle cause della poca efficacia di alcuni trattamenti antitumorali. Alcuni studi hanno dimostrato che l'elevata espressione della survivina, porta a resistenza sia nei confronti di farmaci citotossici che della radioterapia (Ryan, et al., 2009).

### 1.1.7 Approcci terapeutici diretti verso la survivina

In virtù della sua funzione di possibile target nella terapia antitumorale, sono state realizzate molteplici strategie per ridurre l'espressione della survivina e quindi la sua funzione. Alcune di queste strategie terapeutiche hanno raggiunto la sperimentazione clinica (Tabella 2).

<b>Approccio terapeutico</b>	<b>Molecola</b>	<b>Stato dello studio</b>	<b>Tipo di tumore</b>
<b>Inibizione della traduzione</b>	- Oligonucleotidi anti-senso (LY2181308)	Ritirato	Tumore al polmone;epatocarcinoma
	- Aptameri (ENZ-3042)	Fase I/II	Leucemia acuta linfoblastica
	- Gataparsen	Fase II	Tumore al seno
<b>Inibizione della trascrizione</b>	- YM155	Fase I/II	Tumori solidi
	- Terameprocol	Fase I	Leucemie, Tumore della testa e del collo
<b>Potenziamento del sistema immunitario (vaccini)</b>	- LTLGEFLKL	Fase II	Melanoma
	- HLA-A2	Terminato	Tumore pancreas
	- EMD640744	Fase I	Tumori solidi
	- DepoVax™ (DPX-0907)	Fase I/II	Tumore al seno, ovaie e prostata
<b>Antagonisti Hsp 90</b>	- Tanespimycin	Fase I	Tumore colon-retto
	- Tanespimycin + Bortezomib	Fase III	Mieloma multiplo
<b>RNA Interfering</b>	siRNA	Studi preclinici	Tumori solidi

**Tabella 2** Strategie anti-tumorali basate sul blocco della survivina.

- Il composto LY2181308 (ISIS/Eli Lilly Pharmaceuticals) è un oligonucleotide anti-senso in grado di inibire l'espressione della survivina. In studi di fase II condotti su pazienti con tumore al polmone purtroppo i promettenti risultati preclinici non sono stati confermati (Carrasco et al., 2011), probabilmente in quanto la survivina non rappresenta un meccanismo dominante nello sviluppo della chemio-resistenza. Il composto è stato testato anche su pazienti affetti da epatocarcinoma. Gli studi di fase I hanno mostrato una buona sicurezza e tollerabilità del

prodotto ma gli studi di fase II sono stati annullati prima dell'arruolamento dei pazienti per lo studio (clinicaltrials.gov, 2016).

- Diversi siRNA (piccoli sequenze di RNA ad azione silenziante) che vanno ad agire inibendo la survivina con risultati preclinici promettenti sono in studio ma attualmente non vi sono siRNA anti-survivina in fase clinica.
- Gli aptameri sono acidi oligonucleici che si legano in modo specifico alla molecola bersaglio (Bolhassani, 2011). Il composto ENZ-3042 è un aptamero anti-survina che è stato valutato in studi di fase I e II in pazienti con leucemia linfoblastica acuta in combinazione con agenti chemioterapici (Park et al. 2011). Il composto non è risultato in grado di portare ad una significativa riduzione della survivina pertanto l'ulteriore sviluppo clinico è stato interrotto (Raetz et al., 2014).
- il composto YM155 (*1-(2-Methoxyethyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-ihydro-H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide*) (Astellas Pharma Inc) è una piccola molecola in grado di ridurre l'espressione della survivina. In particolare, si lega con ILF3 (*interleukin enhancers-binding factor 3*), a cui viene impedito di legarsi con la proteina p54 portando alla mancata formazione del complesso ILF3/p54 e quindi al mancato riconoscimento di una sequenza specifica del gene promotore della survivina. Questo porta ad un silenziamento a livello trascrizionale della survivina (Yamamuchi et al., 2012). Studi di fase I condotti su 41 pazienti affetti da tumori solidi, in cui YM155 era associato a paclitaxel e docetaxel, hanno mostrato buoni risultati riguardo alla tollerabilità del farmaco ma, i successivi studi di fase II non sono andati a buon fine (Kelly et al., 2013). Un altro composto che possiede un'azione simile all'YM155 è il Terameprocol (*tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid*) che è stato sottoposto a vari studi di fase I. In uno studio condotto su pazienti con tumori alla testa o al collo a cui venivano somministrati 20 mg/cm<sup>3</sup>, in 5 di essi è stato dimostrato che il tumore andava incontro a necrosi senza coinvolgere i tessuti adiacenti (Dunphy, et al. 2004). Un altro studio di fase I è stato condotto su pazienti affetti da leucemia e, in esso il composto ha mostrato buona tollerabilità e bassa tossicità (Tibes et al., 2015)
- Il Gataparsen è un oligonucleotide antisense diretto verso la survivina. Gli studi clinici di fase I, condotti su 40 pazienti con tumore al seno trattati con concentrazioni tra 100 mg e 1000 mg hanno mostrato una riduzione dell'espressione della survivina del 20% ed un incremento dell'apoptosi nelle cellule tumorali (Tablot and Ranson, 2010). Attualmente Gataparsen ha raggiunto gli studi clinici di fase II.
- Vaccini anti-survivina. Il potenziamento del sistema immunitario, è un metodo convalidato per ottenere risposte tumore-specifiche e migliorare la sopravvivenza dei pazienti (Chapuis et al., 2012). Questo tipo di terapia si basa sul riconoscimento di particolari antigeni presenti nelle cellule tumorali da parte dei linfociti T come ad esempio gli HLA (Human Leucocyte Antigens). La survivina è considerata un TAA (antigene tumore

associato) e quindi risulta un potenziale bersaglio per l'immunoterapia. La sua immunogenicità è stata valutata attraverso la presenza di linfociti T CD8+ survivina-specifici e di IgG anti-survivina nei pazienti affetti da cancro (Reuschenbach M, et al., 2009). In uno dei primi studi clinici fatti, 5 pazienti con melanoma in stato avanzato sono stati trattati con il vaccino anti-survivina LTLGEFLKL e 4 pazienti su 5 hanno registrato un incremento di cellule T (Otto et al., 2005). Sfortunatamente lo studio è fermo da 2 anni (clinicaltrials.gov, 2016). In un altro studio clinico, un paziente con cancro pancreatico in stadio avanzato, è stato vaccinato con una versione modificata dell'HLA-A2 ed è stata ottenuta una remissione del tumore per 8 mesi. Tuttavia, quando il trattamento è stato sospeso, si sono ripresentate metastasi ed il paziente è andato incontro a morte (Wobser M et al., 2006). Sono stati testati anche altri vaccini come l'EMD640744: un vaccino progettato per bersagliare la survivina nei tumori solidi. Questo farmaco ha completato gli studi di fase I ed è risultato capace di stimolare la risposta dei linfociti T contro la survivina nella maggior parte dei pazienti sottoposti allo studio (Lennerz and Gross, 2014). L'altro vaccino in fase di studio è il DepoVax<sup>TM</sup> (DPX-0907) in cui antigene e immunostimolante sono formulati in liposomi. Studi di fase I condotti su pazienti con tumore al seno, tumore alle ovaie e tumore alla prostata, hanno evidenziato che si ha una promozione della risposta immunitaria garantendo un ulteriore sviluppo clinico al vaccino (Berinstein & Karkada, 2012).

- Gli antagonisti Hsp 90 (*Heat shock protein 90*) sono molecole che agiscono bloccando il processo di accoppiamento tra la Hsp90 e la survivina in quanto la proteina Hsp90 funziona da trasportatore per la survivina. Tra di essi troviamo il composto *Tanespimycin (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)* (Bristol- Myers Squibb). Studi di fase I condotti su 21 pazienti affetti da tumore al colon-retto sono stati eseguiti per valutare la massima dose tollerata e la minima dose tossica. È stato notato che il farmaco era ben tollerato ma non produceva effetti anticancro (Goetz et al., 2005). *Tanespimycin* è stato studiato anche in combinazione con agenti chemioterapici, ad esempio bortezomib, in pazienti affetti da mieloma multiplo. Studi di fase I hanno dimostrato che l'associazione tra i due farmaci era ben tollerata (Richardson et al., 2005). Studi successivi di fase II hanno mostrato che l'associazione dei due farmaci portava ad una stabilizzazione della malattia in 18 dei 67 pazienti arruolati per lo studio con una sopravvivenza complessiva media di 13 mesi (Richardson PG, 2009). Studi di fase III sono ancora in corso.

Tra le strategie cosiddette “antisense”, ovvero rivolte a ridurre l'espressione di specifici geni, vi sono i ribozimi e, fra questi, una tipologia molto utilizzata è quella chiamata “a testa di martello (*Hammerhead*)”, per la particolare conformazione tridimensionale.

## 1.2 Il Ribozima testa di martello (hammerhead)

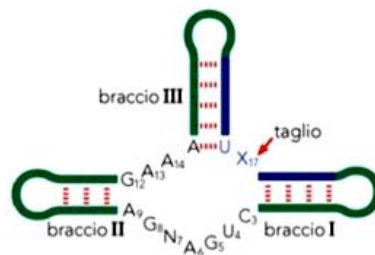
Fino agli inizi degli anni '80, l'RNA era visto come una molecola che si limitava a trasferire informazioni genetiche dal nucleo al citoplasma. Tuttavia, nel 1982,

Thomas Cech e Sidney Altman scoprirono le proprietà catalitiche dell'RNA (Cech, 1990). Queste molecole di RNA con attività catalitica sono state chiamate ribozimi. Tra questi, troviamo i ribozimi a testa di martello o hammerhead che sono i più piccoli RNA catalitici dotati di attività endoribonucleolitica (Uhlenbeck, 1987). I ribozimi hammerhead furono scoperti all'interno di RNA naturali di forma circolare presenti in viroidi e virusoidi di alcuni virus delle piante (Symons, 1987).

I viroidi sono molecole di RNA infettive che non hanno rivestimento proteico; i virusoidi sono inglobati all'interno del virus e, per replicarsi, hanno bisogno dell'assistenza del virus. La replicazione di questi RNA circolari avviene per "rolling circle". Questo tipo di replicazione produce un singolo filamento, chiamato multimer, costituito da copie multiple della sequenza di partenza. All'interno di tale filamento, troviamo i motivi catalitici hammerhead dotati di attività catalitica in *cis* cioè capaci di promuovere il taglio all'interno del filamento della sequenza target producendo monomeri lineari che poi verranno circularizzati.

Alla fine degli anni '80 i ribozimi hammerhead sono stati ingegnerizzati, producendo molecole con attività di scissione in *trans* cioè capaci di tagliare altre sequenze di RNA promuovendo una scissione sequenza-specifica (Citti e Rinaldi, 2005).

Un ribozima hammerhead (Fig.5) è formato da:



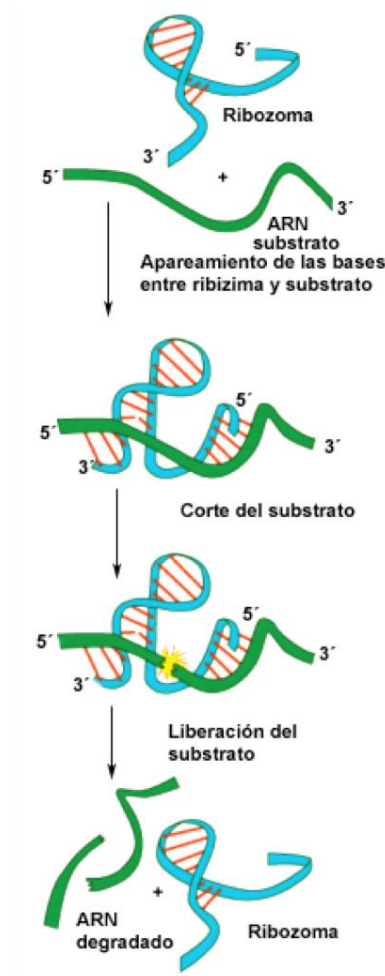
**Figura 5** Rappresentazione schematica della struttura primaria di un ribozima hammerhead

- Un dominio strutturale costituito dallo Stem II necessario per mantenere la corretta conformazione tridimensionale del ribozima
- Un dominio catalitico costituito da due sequenze non contigue che collegano lo Stem I con lo Stem II e lo Stem II con lo Stem III. Questa porzione è responsabile della reazione di scissione.
- Un dominio di legame costituito da due "braccia" che si trovano ai due estremi opposti del ribozima per quanto riguarda la struttura primaria (Fig. 5) ma che si trovano contigui nella conformazione ripiegata, cataliticamente attiva dello stesso. Le porzioni delle due braccia appaiate con l'RNA bersaglio sono lo Stem I (estremità 5' del ribozima) e lo Stem III (estremità 3' del ribozima). (Tedeschi et al., 2009).

La conformazione cataliticamente attiva del ribozima è costituita dallo Stem I e dallo Stem III in posizione contigua. Questa conformazione conferisce alta specificità di legame tra le braccia e la sequenza bersaglio da tagliare (Fig. 6). La formazione del complesso catalitico è influenzata dall'integrità della sequenza bersaglio. Infatti, parziali omologie causate dal legame con l'mRNA di una delle due braccia, portano alla formazione di complessi target-ribozima inattivi ed instabili in cui non si ha la scissione della sequenza bersaglio. È quindi necessario che le sequenze non contigue del ribozima, siano in grado di appaiarsi con le regioni complementari presenti sul bersaglio, in modo da formare un complesso bersaglio-ribozima attivo. Tale caratteristica è stata confermata sperimentalmente da osservazioni che dimostrano come i ribozimi hammerhead possano distinguere tra mRNA che differiscono per un solo nucleotide sia che sia posizionato all'interno delle sequenze complementari, sia che si trovi nelle vicinanze del sito di scissione (Tedeschi et al., 2009).

Il ribozima catalizza una reazione di trans-esterificazione di uno specifico legame fosfodiesterico con la conseguente formazione di due frammenti: il frammento a valle della scissione che contiene in posizione 5' un gruppo idrossile e il frammento a monte che contiene un gruppo 2',3'-fosfato-ciclico.

Importante per il meccanismo di azione è il coinvolgimento di due ioni  $Mg^{2+}$ . Fin dalla scoperta dei ribozimi, è stato ipotizzato che essi fossero dei metallo-enzimi cioè enzimi che richiedessero ioni metallici divalenti per eseguire la reazione di catalisi. Studi hanno evidenziato che la velocità di catalisi dei ribozimi aumenta all'aumentare della concentrazione di  $Mg^{2+}$  (Canny et al., 2004). Inoltre è stato riportato che la presenza di ioni metallici bivalenti sposta l'equilibrio tra le specie inattive e la popolazione di ribozimi cataliticamente attivi verso quest'ultime (Martick & Scott, 2006).



**Figura 6** Meccanismo di azione di un ribozima hammerhead

### 1.2.1 Utilizzo in terapia

Ad oggi sono in corso studi clinici sui ribozimi. In particolare, sul sito [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), 2016), sono riportati due studi clinici condotti utilizzando ribozimi: uno su pazienti affetti da HIV e uno su pazienti con tumore ai reni al IV° stadio.

Uno è uno studio randomizzato di fase II a doppio cieco in cui è stata controllata e valutata l'efficacia di cellule autologhe ematopoietiche CD34+ non trasfettate o trasfettate con il ribozima anti-HIV-1 somministrate in pazienti affetti dal virus HIV-1. È stato notato che, nei pazienti affetti dal virus HIV-1, il trattamento è stato in grado di stimolare la produzione di linfociti T CD4+ (Mitsuyasu et al., 2009).

L'altro studio è uno studio aperto di fase II in cui è stato somministrato RPI.4610 un ribozima anti-FLT-1 (*Fms-Related Tyrosine Kinase 1*) a pazienti affetti da tumore ai reni al IV° stadio con metastasi alle ossa. RPI.4610 dovrebbe arrestare la crescita delle metastasi limitando l'afflusso di sangue al tumore bloccando la



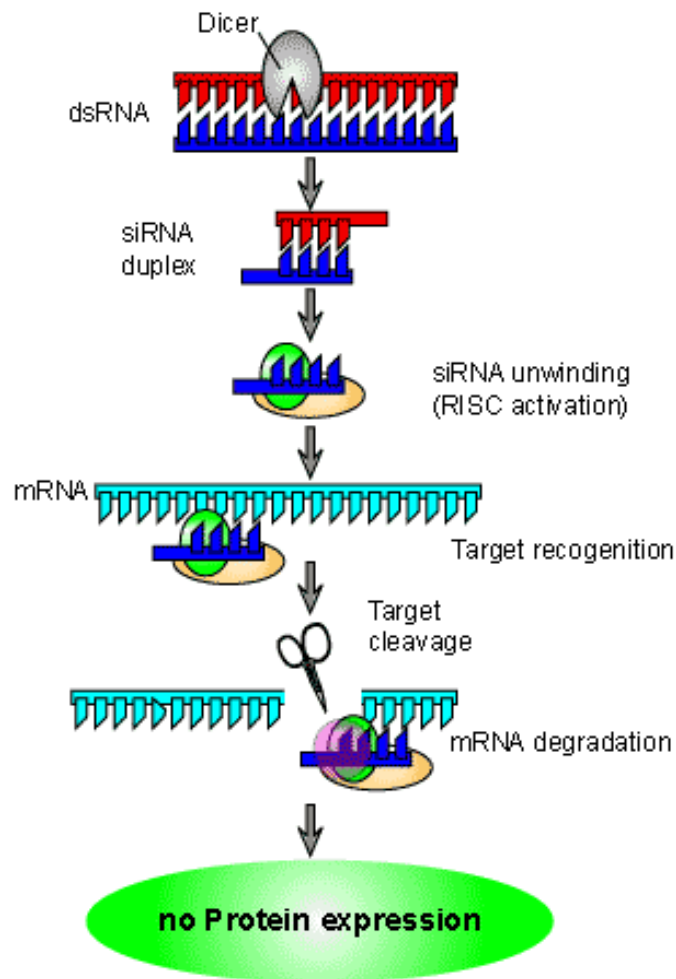
traduzione dell'mRNA del VEGF-1 (*vascular endothelial growth factor 1*) (clinicaltrials.gov, 2016). Negli studi di fase I, tale ribozima ha mostrato un'eccellente sicurezza e tolleranza fino ad una dose di 300 mg/m<sup>2</sup> attraverso iniezioni sottocutanee. Lo studio ha subito una fase di arresto dovuto alla mancanza di efficacia clinica di tale ribozima (Weng et al., 2005). Morrow ed i suoi collaboratori, in uno studio di fase II, hanno testato l'RPI.4610 su pazienti con tumore al seno che hanno avuto problemi con almeno un ciclo di chemioterapia, per valutarne il tasso di risposta. I risultati non hanno dato né piene né parziali risposte e quindi anche se RPI.4610 ha dimostrato un profilo di sicurezza ben tollerato, la sua mancanza di efficacia clinica preclude questo farmaco da un ulteriore sviluppo (Morrow et al, 2012).

### **1.3 Short-interfering RNA**

I "short-interfering" RNA (siRNA) sono molecole di RNA a doppio filamento composte da 21-23 nucleotidi, in cui uno dei due filamenti è complementare ad una porzione della sequenza di mRNA e di cui porta all'inibizione della traduzione. Il loro meccanismo di azione prevede il legame con il complesso multi proteico RISC (*RNA induced silencing complex*) che ha attività ribonucleasica.

I siRNA sono prodotti a livello fisiologico ma la loro produzione, può essere indotta anche farmacologicamente oppure essere sintetizzati e veicolati nelle cellule utilizzandoli come strumenti di terapia genica.

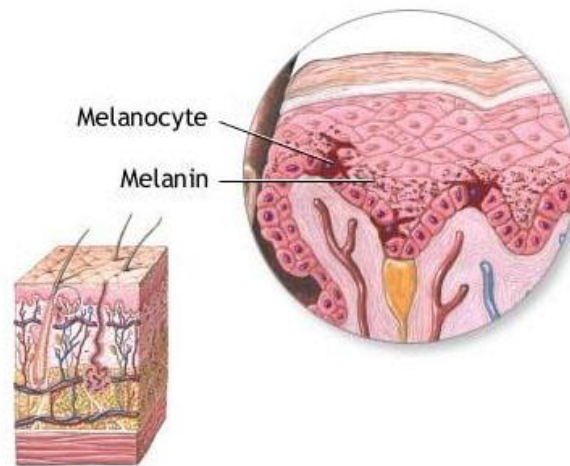
Nelle cellule i siRNA sono prodotti attraverso un taglio enzimatico di RNA a doppio filamento (dsRNA) ad opera dell'enzima endoribonucleasi Dicer. Il siRNA che si forma (siRNA duplex), si associa al complesso RISC (*RNA induced silencing complex*) che riduce il siRNA duplex in siRNA a singolo filamento. Il complesso siRNA-RISC si lega alla sequenza bersaglio di mRNA producendo un taglio catalitico che divide il filamento di mRNA in due segmenti che non subiscono il processo di traduzione riducendo l'espressione proteica (Fig 7).



**Figura 7** Meccanismo di azione di siRNA (Siomi H et al., 2009)

#### 1.4 Il Melanoma cutaneo

Il melanoma cutaneo è uno dei tumori della pelle più aggressivi che origina in seguito alla trasformazione oncogenica dei melanociti. I melanociti si trovano a livello della cute, più precisamente a livello del derma e dello strato basale dell'epidermide, dove sono disseminate tra i cheratinociti. I melanociti presentano una forma stellata poiché hanno dei prolungamenti che si insinuano negli spazi intercellulari per trasferire la melanina, pigmento di protezione contro la radiazione solare, ai cheratinociti (Fig. 8).



**Figura 8** Struttura della pelle e localizzazione dei melanociti (Training.seer.cancer.gov, 2016)

La melanina serve a neutralizzare i radicali liberi che si formano dal contatto delle radiazioni UV con la cute. Queste radiazioni però, possono portare a un danneggiamento e ad una trasformazione delle cellule con possibile sviluppo di neoplasie

Il melanoma cutaneo ha un'elevata incidenza. A livello globale, ogni anno, si verificano 132000 nuovi casi. I più elevati tassi d'incidenza si registrano in Australia, USA, Nuova Zelanda e nei Paesi del Nord Europa (12-20 casi ogni 100000 persone contro 3-5 casi ogni 100000 persone nell'Europa Mediterranea). La mortalità risulta più alta nei soggetti maschi rispetto alle femmine (3 contro 2) mentre l'incidenza è maggiore nelle donne rispetto agli uomini (7 vs 6). In Italia, ogni anno si diagnosticano 7000 nuovi casi e si registrano circa 1500 decessi all'anno (www.fondazionemelanoma.org, 2016).

I soggetti da ritenersi a rischio sono caratterizzati da:

- Carnagione chiara e presenza di lentiggini
- Occhi di colore verdi o azzurri
- Maggiore tendenza alle bruciature che all'abbronzatura
- Capelli chiari o rossi
- Presenza in famiglia di parenti che sono soggetti a tumori della pelle

(World Health Organization, 2016).

#### 1.4.1 Terapie del melanoma

La terapia contro il melanoma presenta numerose difficoltà. Ad oggi, la strategia più efficace risulta essere l'escissione chirurgica ma, ciò vale solo per gli stadi precoci della malattia (Hartman & Czyz, 2013).

In base allo stadio del melanoma, l'NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) ha stabilito delle linee guida per lo svolgimento della terapia anti-

melanoma Il melanoma cutaneo presenta 5 livelli di stadiazione qui di seguito riportati e che richiedono trattamenti diversi.

I soggetti con melanoma allo stadio I-II possono essere ulteriormente sottoposti alla biopsia del linfonodo sentinella in quanto il suo stato rappresenta un importante fattore prognostico (NCCN Guidelines, 2-2016)

Il trattamento del melanoma primario e secondario prevede l'escissione chirurgica totale che è il primo trattamento che viene effettuato nei soggetti con melanoma. Tuttavia in alcuni casi, l'escissione non è sempre eseguibile a causa di fattori estetici. In questi casi si può procedere con radioterapia. Nei pazienti con melanoma primario può essere fatta anche una biopsia del linfonodo sentinella per individuare possibili metastasi linfonodali ad elevato rischio di recidiva in modo da sottoporli ad un'eventuale terapia sistemica adiuvante o alla completa rimozione del linfonodo sentinella (NCCN Guidelines, 2-2016).

Il trattamento dei pazienti con melanoma al terzo stadio prevede oltre all'escissione totale e l'analisi del linfonodo sentinella anche la completa dissezione dei linfonodi a livello del bacino. Questa viene effettuata quando c'è il rischio che siano coinvolti i linfonodi pelvici seguendo tre criteri:

- coinvolgimento di tre o più linfonodi superficiali
- positività clinica dei linfonodi superficiali
- positività del linfonodo di Cloquet

Esistono diverse opzioni di trattamento per pazienti con melanoma al terzo stadio in base alla grandezza, alla localizzazione e al numero di metastasi. Ad oggi, ci sono numerosi approcci non chirurgici utilizzati al posto dell'escissione. Tra questi troviamo:

- Iniezione locale con il bacillo di Calmette-Guérin
- Somministrazione di interleuchina-2 o di interferone  $\alpha$
- Ablazione con laser

Oltre a queste terapie, i soggetti possono essere sottoposti ad una terapia adiuvante o ad una terapia sistemica.

Il trattamento del melanoma metastatico prevede l'asportazione nel caso di metastasi circoscritte in modo da evitare la diffusione in altri distretti e poi sottoporre il paziente ad una terapia adiuvante. Alternativamente, i pazienti, sono trattati con terapia sistemica. Nel caso di metastasi diffuse, i pazienti sono sottoposti a terapia sistemica o a cure palliative. Nel caso di una terapia sistemica, è molto importante valutare diversi fattori tra cui lo stato della mutazione del gene BRAF e la presenza o assenza di sintomi legati al cancro. Pazienti con melanoma metastatico è preferibile sottoporli ad immunoterapia; pazienti con melanoma BRAF mutato che hanno malattie sintomatiche possono essere trattati con una terapia a bersaglio (NCCN Guidelines, 2/2016)

La terapia adiuvante si basa sulla somministrazione di interferone a basse e ad alte dosi. L'NCCN però sconsiglia l'uso di interferone a basse dosi in quanto studi hanno dimostrato che non c'è alcun miglioramento in termini di sopravvivenza

complessiva. L'interferone somministrato ad alte dosi invece, è stato valutato in numerosi studi clinici randomizzati ed è stato notato che porta ad un piccolo incremento della sopravvivenza da recidiva. Nello studio EORTC, è stato somministrato interferone combinato con polietilenglicol (PEG) a pazienti con melanoma al terzo stadio per 5 anni ed è stato osservato che, la sopravvivenza senza recidive è aumentata rispetto al gruppo dei controlli (45.6% vs 38.9%). Questo dato ha portato l'FDA (*Food and Drug Administration*) nel 2011 ad inserire l'interferone PEGilato come opzione nella terapia del melanoma con coinvolgimento linfonodale (NCCN Guidelines, 2/2016).

La terapia sistemica può essere effettuata utilizzando agenti immuno-modulatori, a bersaglio molecolare, vaccini e non solo.

L'immunoterapia utilizza sostanze in grado di modulare l'attività del sistema immunitario, come l'ipilimumab, il pembrolizumab e il nivolumab. L'Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) è un anticorpo monoclonale IgG1 completamente umanizzato che si lega al CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) in modo da aumentare la proliferazione, l'attivazione e l'efficacia dei linfociti T (Hodi et al., 2010). In diversi studi clinici, Ipilimumab ha dato risultati promettenti riguardo alla sopravvivenza complessiva in pazienti con melanoma in stato avanzato estendendo la prospettiva di vita fino a 10 mesi (Schadendorf et al., 2015). L'FDA ha approvato l'utilizzo di Ipilimumab nel 2011.

Il Pembrolizumab (Merck) è un anticorpo monoclonale IgG4 umanizzato altamente selettivo contro il ligando PD-L1 (*Programmed death ligand 1*) che produce una risposta duratura nei pazienti con melanoma metastatico (Robert et al., 2015). Pembrolizumab è stato approvato dall'FDA nel 2014 e, studi comparativi con Ipilimumab hanno evidenziato che, in pazienti con melanoma in stato avanzato, porta ad un prolungamento del grado di sopravvivenza (47.3% vs 26.5%) e possiede un grado di tossicità minore (13.3% vs 9.9%) (Robert et al., 2015).

Un altro inibitore PD-1 è il Nivolumab (Bristol-Myers Squibb). Il Nivolumab è un anticorpo IgG4 completamente umanizzato che è stato oggetto di uno studio su pazienti con melanoma avanzato refrattari al trattamento con Ipilimumab. È stato osservato un alto grado di risposta (31.7% vs 10.6%) e una minore comparsa di reazione avverse farmaco dipendenti (5% vs 9%) (Weber et al., 2015). Un altro studio di fase III ha comparato Nivolumab con decarbazina ed è stato dimostrato l'aumento dell'aspettativa di vita di 1 anno in pazienti con melanoma avanzato senza la mutazione del gene BRAF (Robert et al., 2015).

La terapia a bersaglio molecolare prevede l'utilizzo di composti che agiscono come BRAF inibitori e come MEK inibitori. Tra i BRAF inibitori troviamo Vemurafenib e Dabrafenib. Entrambi, sono stati sottoposti a studi clinici di fase III su pazienti con melanoma al IV° stadio con mutazione del gene BRAF comparandoli con la decarbazina. I risultati ottenuti, mostrano un aumento dell'aspettativa di vita rispetto ai soggetti trattati con decarbazina, rispettivamente di 5.3 mesi per Vemurafenib (vs 1.6 mesi nei soggetti trattati con decarbazina) e

5.1 mesi per Dabrafenib (vs 2.7 mesi nei soggetti trattati con decarbazina) (Hauschild et al., 2012). Nel 2014 è stato approvato l'utilizzo di Dabrafenib da parte dell'FDA e dell'EMA; nel 2015 è stato autorizzato anche l'utilizzo di Vemurafenib.

Tra i MEK inibitori troviamo Trametinib e Cobimetinib. Questi composti vanno ad agire sulla via BRAF-MEK-ERK inibendola. Trametinib è un inibitore di MEK 1/2 che ha mostrato un aumento della sopravvivenza in pazienti con melanoma metastatico con mutazione del gene BRAF (4.8 mesi vs 1.5 mesi in soggetti sottoposti a chemioterapia) (Flaherty et al., 2012). Cobimetinib viene utilizzato in combinazione con Vemurafenib in pazienti con melanoma metastatico positivo alla mutazione BRAF V600 (Larkin et al., 2014).

Tra i trattamenti in studio c'è l'immunoterapia cellulare adottiva. Si tratta di un trattamento emergente che consiste nell'infusione di linfociti T anti-tumoralì nei pazienti (Rosenberg and Restifo, 2015). Le cellule T che vengono trasferite sono ottenute modificando geneticamente linfociti T che esprimono recettori per le cellule T anti-tumoralì. Studi clinici hanno dimostrato che tale terapia, in combinazione con la rimozione del linfonodo, media una regressione del tumore in pazienti con melanoma avanzato fino a un massimo del 40% (Phan and Rosenberg, 2013). Infine sta emergendo la possibilità di utilizzare virus oncolitici nella terapia del melanoma. Questa tecnica prevede l'utilizzo di virus che si replicano selettivamente nelle cellule tumorali attivando così il sistema immunitario che causa la lisi delle cellule tumorali. Un esempio è dato dal Talimogene laherparepvec (*T-VEC*), un herpes virus geneticamente modificato che viene iniettato direttamente nel melanoma dove si replica. Una volta che le cellule tumorali sono morte, liberano antigeni tumori-specifici che attivano il sistema immunitario (Senzer et al., 2009). In uno studio di fase III (OPTiM) è stata comparata l'efficacia dell'iniezione del T-VEC contro iniezione sottocutanea di GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) su pazienti con melanoma al IV° stadio. Il risultato è stato che il T-VEC ha mostrato un tasso di risposta globale superiore a quello di GM-CSF (26.4% vs 5.5%) (Engeland et al., 2014). Nell'ottobre 2015, l'FDA ha autorizzato l'utilizzo del T-VEC come prima terapia con virus oncolitici.

## Capitolo II

### Scopo della tesi

La survivina è una proteina in grado di inibire l'apoptosi, sovra-espressa in diversi tipi di tumori tra cui il melanoma cutaneo, e non rilevabile nei tessuti sani differenziati adulti. L'attività di farmaci silenzianti o inibenti la survivina può essere valida dal punto di vista terapeutico nei tumori, in particolare permettendo di contrastare la chemioresistenza a farmaci proapoptotici. A conferma di ciò, come è stato descritto nella *Introduzione* della presente tesi, diverse tipologie di farmaci, sia biotecnologici che non, in grado di contrastare l'attività antiapoptotica della survivina sono attualmente in sperimentazione clinica. Nel laboratorio di "Farmacologia molecolare e cellulare" del Dipartimento di Farmacia di Pisa, dove è stata svolta la presente tesi, gli effetti proapoptotici del silenziamento genico da parte di un oligonucleotide antisurvivina sono stati recentemente descritti (Carpi et al., 2014). Un tipo di oligonucleotide che è in grado di svolgere silenziamento genico in maniera diversa dall'oligonucleotide antisense, perché dotato di attività catalitica intrinseca, è il ribozima. Anche i ribozimi sono agenti biotecnologici con potenzialità terapeutiche. Nel laboratorio di "Tecnologie genomiche" del CNR di Pisa è stato sintetizzato dal gruppo della Dr.ssa Tedeschi Lorena un nuovo ribozima diretto verso l'mRNA codificante la survivina, la cui progettazione, sintesi e caratterizzazione cinetica sono stati descritti in precedenti lavori di tesi (Valutazione dell'effetto di mismatch nell'appaiamento sull'attività in vitro del ribozima *hammerhead* diretto contro l'RNA messaggero di BIRC 5: scissione di una sequenza di RNA che si trova nel trascritto di FAS, Irene Lepori).

Nel presente lavoro di tesi, l'attività silenziante e farmacologica del ribozima *hammerhead extended* è stato valutato in vitro su cellule di melanoma cutaneo umano A375.

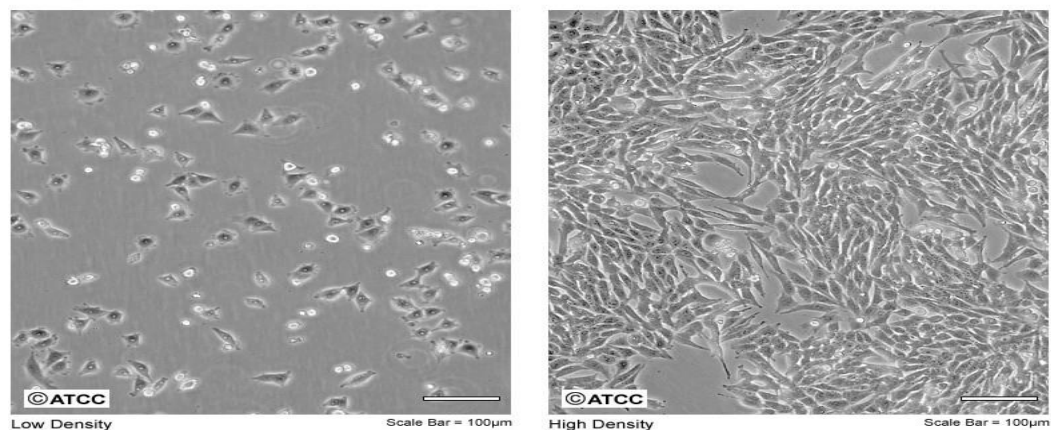
# Capitolo III

## Materiali e metodi

### 3.1 Materiali per studi funzionali

#### Linea cellulare A375

Il modello sperimentale utilizzato è la linea di cellule di melanoma cutaneo A375 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville; MA, USA) (Fig.9) caratterizzate da un tempo di replicazione di 30 ore in incubatore ad una temperatura di 37°C ed una % di CO<sub>2</sub> del 5%. Hanno forma allungata e crescono in adesione in un terreno di coltura costituito dal mezzo base Dulbecco's Modified Medium (DMEM) ricostituito con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e l' 1% di penicillina (50 UI/ml) streptomicina (50 µg/ml).



**Figura 9** Cellule A375 a basso (Sinistra) e alto (Destra) tasso di crescita.

#### DMEM

Il *Dulbecco's Modified Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è il terreno di coltura utilizzato per la proliferazione delle cellule A375. Esso è costituito da amminoacidi, vitamine, sali, glucosio, glutammina e, rosso fenolo come indicatore di pH. Per valori di pH intorno a 7.4 che sono ideali per la proliferazione cellulare, presenta una colorazione rossa che vira al giallo in seguito ai prodotti del metabolismo cellulare. Può assumere anche una colorazione violacea e ciò indica che le cellule non sono metabolicamente attive o c'è un'alterazione della CO<sub>2</sub>.



### **FBS**

Il siero fetale bovino (FBS, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è costituito da fattori di crescita e proteine che facilitano la proliferazione, la sopravvivenza e la divisione cellulare.

### **Penicillina/Streptomicina**

La miscela in rapporto 1:1 di questi antibiotici (penicillina 50UI/ml e Streptomicina 50µg/ml, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) evita la proliferazione batterica all'interno della coltura cellulare.

### **Trypsina**

La tripsina-EDTA (Trypsine-Versene (EDTA) Mix 10x, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è una soluzione contenente la tripsina, una proteasi che agisce praticando un taglio proteolitico a livello dell'amminoacido arginina (che si trova nelle membrane cellulari) e la lisina (localizzata a livello del supporto di coltura) determinando il distacco delle cellule dal supporto. L'EDTA è un agente chelante che aumenta l'azione della proteasi in quanto va a complessare gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  a livello extra-cellulare che agirebbero nascondendo i legami peptidici su cui agisce la tripsina.

### **PBS**

Il tampone fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è un tampone contenente cloruro di sodio 0,0137 M, cloruro di potassio 0,0027 e fosfato di sodio 0,01 M con PH 7.4. Viene utilizzato per allontanare i detriti dalle colture cellulari perché presenta valori di PH isotonici.

### **Trypan Blue**

Il *trypan blue* (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è un colorante utilizzato per la conta cellulare in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Questo perché le cellule vive, avendo la membrana plasmatica intatta, non permettono la penetrazione del colorante nel citoplasma cosa che invece, si verifica nelle cellule morte, la cui membrana ha ormai perso selettività.

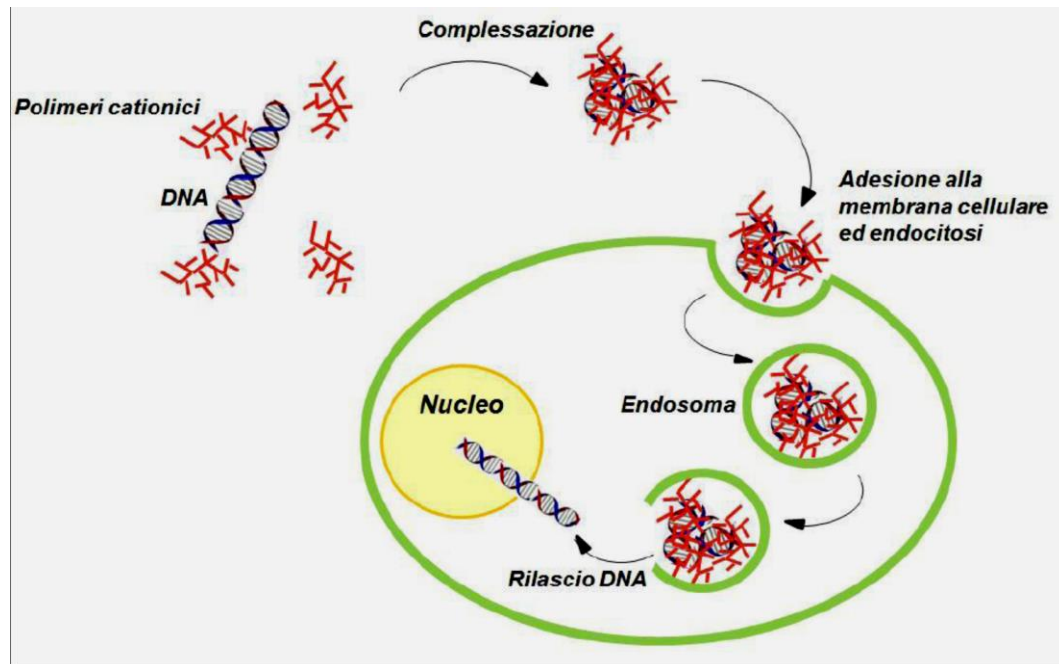
### **DMSO**

Il dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è un reagente utilizzato nel processo di congelamento cellulare. Questa sostanza agisce da crioprotettore per le cellule in quanto impedisce la formazione di cristalli di ghiaccio che possono portare alla lisi della membrana cellulare e quindi a morte cellulare.

### 3.2 Materiali per la trasfezione

#### Lipofectamina 2000

La Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) è un lipide che funziona da agente di trasfezione. Esso è costituito da una coda policationica e una porzione lipidica; la testa cationica si va a legare alle cariche negative dei gruppi fosfato degli acidi nucleici, formando dei complessi lipidi-DNA mentre la porzione lipidica ne veicola l'internalizzazione (Fig.10).



**Figura 10** Schema del processo di trasfezione con lipofectamina.

#### OptiMEM

L'OptiMem (Invitrogen, Milano, Italia) è il mezzo che si utilizza durante il processo di trasfezione. E' una modifica del mezzo MEM, tamponato con acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico e bicarbonato di sodio, completato con ipoxantina, piridina, piruvato di sodio, L-glutammina, oligoelementi e fattori di crescita. Rispetto al mezzo MEM, l'OptiMEM consente una riduzione della supplementazione del 50% in meno di FBS senza modificare la morfologia cellulare e la proliferazione. Ciò è importante perché le proteine contenute nell'FBS interferiscono con la lipofectamina annullando il processo di trasfezione.

#### Ribozima Anti-Survivina

Il ribozima anti-survivina (Rbz BIRC5), da noi tesato, è stato sinterizzato dal gruppo di Tecnologie Genomiche per la progettazione di molecole proteina-specifiche, Istituto di Fisiologia Clinica- Centro Nazionale Ricerche di Pisa, coordinato dalla ricercatrice Lorena Tedeschi.

Si tratta di un oligoribonucleotide in grado di legarsi, in modo specifico all' mRNA codificante per la proteina survivina umana BIRC-5.

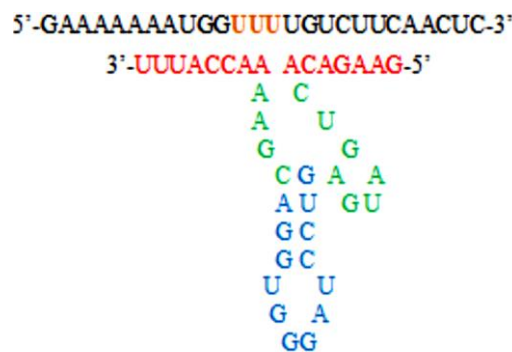
In particolare il ribozima sviluppato è diretto verso la sequenza 5'-GAAAAAAUUGGUUUUGUCUUAACUC-3' all'interno del trascritto di BIRC5. La sequenza scelta all'interno dell'RNA messaggero di BIRC5 è costituita da un totale di 26 nucleotidi ed è presente nelle varianti 1, 2, 3, X1 e X2 .

Il ribozima anti-survivina (Rbz-BIRC5) presenta la seguente sequenza:

**5'-UAA**GAAGACA**CUGAUGAGUCCUAGGGUGGACGAA**AACCAUUU**-3'**

Le lettere colorate in rosso rappresentano il dominio di legame, complementare alla sequenza target di BIRC5, quelle verdi rappresentano il core catalitico mentre quelle in azzurro, lo Stem II. La tripletta in nero rappresenta una porzione aggiunta in 5' rispetto alla struttura di ribozima *minimal* ed è peculiare di questo ribozima. La lunghezza complessiva del ribozima è pari a 42 nucleotidi.

Di seguito possiamo osservare uno schema che rappresenta le precise sequenze del ribozima diretto contro BIRC5, eccetto la tripletta in nero, ripiegato nella sua struttura secondaria, e del target BIRC5, allineato e appaiato con il dominio di legame del ribozima, come avviene durante la reazione di scissione.



**Figura 11.** Rappresentazione schematica della sequenza oligonucleotidica e della struttura secondaria del ribozima diretto contro BIRC5, allineato con la sequenza dello stesso BIRC5. In arancione sono mostrate sul target i tre nucleotidi UUU del sito di cleavage; sul ribozima possiamo riconoscere in rosso il dominio di legame (che porta alla formazione, insieme al target, dello Stem I e dello Stem II), in verde il core catalitico e in azzurro lo stem loop II.

### siRNA anti-survivina

Il siRNA anti-survivina (siR-BIRC5) (OriGene, Maryland, USA), è un oligoribonucleotide specifico verso la sequenza della survivina umana. Questo siRNA bersaglia un gene specifico scelto dalla collezione RefSeq della Genbank umana. La sequenza di tale siRNA è stata scelta dai produttori in base ad un algoritmo e successivamente ottimizzata in modo che non vada a trascrivere altri geni.

## siR scramble

Il siR-*Scramble* (OriGene, Maryland, USA) è un oligoribonucleotide la cui sequenza non è presente nell'uomo, nel topo e nel ratto. Costituisce il controllo negativo del nostro studio.

## 3.3 Materiali per studi di biologia molecolare

### Primer

I primer sono oligonucleotidi sintetici che servono per innescare la sintesi del nuovo filamento di DNA complementare (cDNA) durante la fase di amplificazione della real time-PCR. Per ogni sequenza bersaglio abbiamo bisogno di una coppia di primer: il reverse (complementare al filamento in direzione 5'-3') e il forward (complementare al filamento in direzione 3'-5'). Il gene *housekeeping* scelto, cioè il gene che viene attivamente trascritto e tradotto in modo elevato perché codifica per enzimi e proteine fondamentali per la vita delle cellule, è la  $\beta$ -actina. È stato scelto tale gene perché è espresso in tutti i tessuti, per cui costituisce un buon controllo. Le sequenze dei primer (Tab.3) sono state analizzate con il programma Primer-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per valutare la specificità di ogni coppia per il target ed evitare così la formazione di prodotti di amplificazione genica indesiderati.

Name	Primer nucleotide sequences	Ta (°C)	Amplicon lenght
Beta-actin	5'- AACTGGAACGGTGAAGGTGAC -3' (F)	61	138 pb
	5'- GACTTCCTGTAACAACGCATCTC - 3' (R)		
Survivin	5'- ACCAGGTGAGAAGTGAGGGA -3' (F)	59	309 pb
	5'- AACAGTAGAGGAGCCAGGGA - 3' (R)		

**Tabella 3** Sequenze dei primer utilizzati in RT-PCR; F primer forward, R primer reverse

### Kit e reagenti

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule è stata effettuata utilizzando l'RNasy Mini Kit (Quiagen, Milano, Italia).

La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando il kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, Milano, Italia).

La real-time PCR è stata effettuata utilizzando la sonda SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYNBR<sup>R</sup> Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA).

L'estrazione proteica è stata eseguita utilizzando il tampone di lisi Ripa (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

### 3.4 Materiali per Western blotting

#### SDS

Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che provoca la distruzione delle strutture secondarie e terziarie delle proteine in quanto ne va a rompere i legami a idrogeno e le interazioni idrofobiche. L'SDS rende costante il rapporto massa/carica delle proteine che vengono separate in base al loro peso molecolare. Viene utilizzato in soluzione sciogliendo 1 g di SDS in 10 ml di acqua milliQ.

#### Soluzione di acrilamide/bisacrilamide

La soluzione di acrilamide/bisacrilamide 30% (Euroclone, Italia) è costituita da monomeri di acrilamide e da piccole quantità di N,N'-metilenbisacrilamide più nota come bis-acrilammide. La composizione della miscela è 37,5 parti di acrilamide e una parte di bisacrilamide.

#### Catalizzatori: APS e TEMED

La tetrametilendiammina (TEMED) (Bio-Rad, CA, USA) e il persolfato di ammonio (APS) (Bio-Rad, CA, USA) sono catalizzatori utilizzati per velocizzare il processo di gelificazione. Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato, derivante dal APS presente in soluzione, portando alla formazione di un radicale libero che, reagendo con un monomero di acrilamide, genera un ulteriore radicale libero che legherà un altro monomero di acrilamide.

#### Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- anticorpo monoclonale di topo diretto verso la porzione dall'amminoacido 1 al 142 della survivina umana (sc-17779; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Peso molecolare 17 KDa. Diluizione 1:200.
- anticorpo monoclonale di topo diretto verso la porzione dall'amminoacido 50 a 70 della  $\beta$ -Actina di origine umana (MAB1501, Merck Millipore, Germany). Peso molecolare 43 KDa. Diluizione 1:5000.
- anticorpo monoclonale di topo diretto verso la regione contenente la tirosina 204 fosforilata della proteina ERK 1 e ERK 2 (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Peso molecolare: pERK 1 44 KDa e pERK 2 42 KDa. Diluizione 1:500.
- anticorpo monoclonale di topo diretto verso la porzione dall'amminoacido 101 a 172 della proteina ERK 1 e ERK 2 (sc-514302, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Peso molecolare: ERK 1 44 KDa e ERK 2 42 KDa. Diluizione 1:200.

L'anticorpo secondario utilizzato è:

## Capitolo III

- anticorpo di capra anti-topo coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (HRP) (A 4416, Sigma, Missouri, USA). Diluizione 1:5000.

### **ECL**

La soluzione ECL (Euroclone, Milano, Italia) è un reattivo chemio luminescente basato sul luminolo che ha alta selettività per la perossidasi di rafano (HRP). La soluzione viene preparata miscelando 2 reagenti: la soluzione A (luminol/enhancer) e la soluzione B (tampone perossido) in rapporto 1:1

### **Gamma globulina**

La  $\gamma$ -globulina è la proteina utilizzata come standard per la costruzione della retta di taratura utilizzata nella quantizzazione proteica. La soluzione madre viene preparata sciogliendo 0.1 mg di  $\gamma$ -globulina in 1 mL di acqua milliQ.

### **Reattivo di Bradford**

Il reattivo di Bradford (Bio-rad, CA, USA) è il reagente colorante utilizzato nella quantizzazione proteica. La soluzione è composta dal colorante (Coomassie Brilliant Blue G-250), dall'acido fosforico e dal metanolo.

## **3.5 Materiali per valutazione di vitalità cellulare**

### **Rosso neutro**

Il rosso neutro (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) è un colorante vitale utilizzato per il monitoraggio delle cellule vive. La sua caratteristica è quella di penetrare nelle cellule vive, attraverso trasporto attivo, e di essere incorporato nei lisosomi mentre non penetra nelle cellule morte. L'utilizzo di questo colorante ci permette di andare a valutare il numero di cellule vive e morte dopo un trattamento. La soluzione che abbiamo utilizzato è costituita da rosso neutro allo 0.33%.

### **Soluzione di solubilizzazione**

La soluzione di solubilizzazione è una soluzione composta dall' 1% di acido acetico, dal 50% di etanolo e dal 49% di acqua. Viene utilizzata per liberare il rosso neutro contenuto nei lisosomi delle cellule vive.

### **Cristal violetto**

Il cristal violetto (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è un colorante che si lega al DNA presente nelle cellule sia vitali che non vitali. Viene utilizzato in concentrazione allo 0.5% v/v e preparato solubilizzando 0.05 gr di cristal violetto in 2,5 ml di metanolo e 7,5 ml di acqua distillata e poi filtrato.

## Metodi

### 3.6 Metodi usati negli studi funzionali

#### 3.6.1 Scongellamento linea cellulare

Lo scongelamento è il processo attraverso cui le cellule vengono riportate in uno stato metabolico attivo da una condizione di quiescenza.

Il protocollo prevede:

- Prelevare il criotubo dall'azoto liquido e metterlo in ghiaccio.
- Scongellare il contenuto del criotubo in bagnomaria. Ruotare delicatamente il flaconcino e osservare il progredire dello scongelamento. Non immergere il tappo del flacone nel bagno d'acqua in quanto ciò potrebbe contaminare le cellule.
- Quando solo un cristallo di ghiaccio rimane piccolo, immergere la fiala intera in etanolo per sterilizzare.
- Lavorando sotto cappa a flusso laminare, trasferire il contenuto del criotubo in una provetta sterile da 15 ml.
- Aggiungere lentamente 5 ml di mezzo di coltura ricostituito, precedentemente riscaldato a 37°C. Scuotere delicatamente per mescolare continuamente le cellule con il nuovo mezzo.
- Centrifugare a 1100 rpm per 5 minuti
- Aspirare il surnatante e risospendere il pellet nel mezzo completo
- Seminare le cellule in una fiasca T25 e incubare (37°C e 5% CO<sub>2</sub>).

#### 3.6.2 Mantenimento in coltura

Le fiasche (Starsted, Verona, Italia), contenenti le cellule in fase di crescita esponenziale, sono conservate in incubatore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> e devono essere controllate quotidianamente in modo da sostituire il mezzo consumato con del mezzo fresco eliminando così le sostanze di scarto e apportando nuove sostanze nutritive utili per la proliferazione cellulare. Quando le cellule sono quasi a confluenza (ricoprono il 75-80% della superficie totale della fiasca) per evitare che formino multistrati cellulari devono essere staccate.

Il procedimento prevede:

- Aspirare il mezzo di coltura.
- Lavare con PBS in modo da eliminare i detriti cellulari e permettere l'azione della tripsina eliminando l'FBS.
- Aggiungere la tripsina 10X diluita in PBS (100 µl di tripsina in 900 µl di PBS). Collocare la fiasca in incubatore per qualche minuto perché la catalisi della tripsina avviene a 37°C.
- Osservare le cellule al microscopio per valutare se le cellule si sono effettivamente staccate.
- A questo punto, con il mezzo precedentemente raccolto, inattivare la proteolisi enzimatica aggiungendolo alla fiasca.

- Trasferire la sospensione in una provetta e centrifugare a 1100 rpm per 5 minuti.
- Aspirare il surnatante e risospendere il pellet nel mezzo di coltura completo.
- Se vogliamo sapere il numero di cellule procedere con la conta cellulare come spiegato nel paragrafo successivo.
- Procedere alla semina nei nuovi supporti.

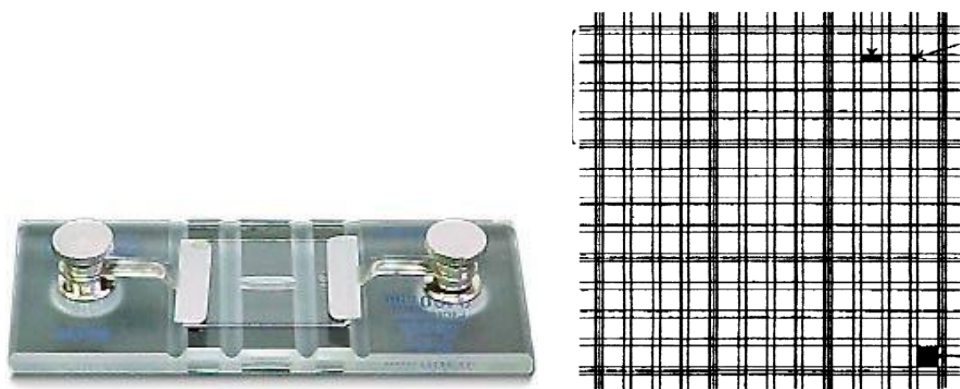
### 3.6.3 Conta Cellulare

La conta cellulare è il metodo attraverso cui si conta il numero di cellule presenti in un volume noto di sospensione. Tale procedura viene eseguita ogni volta che s'intende seminare le cellule per iniziare un trattamento.

Il procedimento prevede:

- Staccare le cellule mediante tripsinizzazione dal supporto come descritto nel paragrafo precedente
- Sospendere il pellet in 1 ml di PBS
- Prelevare 18  $\mu$ l di sospensione e aggiungere 2  $\mu$ l di trypan blue (diluizione trypan blu 1:10)
- Trasferire 8  $\mu$ l nella camera di Burker
- Osservare al microscopio con ingrandimento 20x
- Contare le cellule colorate

La camera di Burker è lo strumento utilizzato per eseguire la conta cellulare. La camera è suddivisa in 9 quadranti e ogni quadrante è suddiviso in 16 quadrati grandi (Fig. 12).



**Figura 12** Camera di Burker (a sinistra); Struttura della camera di Burker (a destra)

Il numero di cellule è dato dalla media della somma delle cellule contate nei 9 quadranti moltiplicata per il volume di PBS utilizzato per risospendere il pellet il tutto moltiplicato per  $10^4$ .



## 3.6.4 Congelamento cellulare

Il congelamento cellulare si effettua quando vogliamo mantenere le cellule in uno stato di inattività metabolica per lungo tempo. Il mezzo di congelamento utilizzato per la linea A375 è stato preparato come segue:

- 90% FBS le cui proteine proteggono le cellule dai danni provocati dal congelamento
- 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) si comporta da crioconservatore in quanto riduce la grandezza dei cristalli di ghiaccio che si formano nelle cellule.

La procedura prevede:

- Eseguire la procedura di tripsinizzazione delle cellule come descritto nel paragrafo precedente e risospendere il pellet ottenuto in un volume di 1,7 ml di mezzo di congelamento.
- Trasferire la sospensione cellulare in un criotubo
- Conservata per 24 ore in un congelatore a -80°C e poi trasferire in azoto liquido.

## 3.7 Trasfezione con lipofectamina

La trasfezione è il processo che permette l'introduzione di materiale genetico esogeno all'interno delle cellule eucariotiche. In questo studio, questa tecnica è stata utilizzata per veicolare il siR-*Scramble*, il Rbz-BIRC5 e il siR-BIRC5 all'interno di cellule di melanoma cutaneo A375.

Il procedimento prevede:

- Seminare le cellule come riportato nella tabella seguente (Tab. 4).

Analisi da effettuare	N°di cellule	Mezzo completo (μl)	Lipofectamina (μl)	Optimem (μl)	Oligonucleotidi (μl) 5 μM	Optimem (μl)
Lisato proteico per Western Blotting o Estrazione mRNA per studio di real-time PCR	15x10 <sup>4</sup>	800	2	98	20	80
Colony assay	500	1000	10	490	100	400
Rosso neutro	3500	50	0,25	24,75	2	23

**Tabella 4** Quantità di cellule e di reagenti da utilizzare per i vari processi di trasfezione con siR-scramble, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM.

In base al protocollo sviluppato, bisogna seminare le cellule in modo da ottenere una confluenza pari al 70-90% nel giorno previsto per il trattamento.

- Preparare due soluzioni seguendo i quantitativi riportati in tabella 4: una con l'oligonucleotide diluito in Optimem e l'altra con la Lipofectamine 2000 diluita in Optimem
- Lasciarle riposare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Mescolare le due soluzioni e incubare per 20 minuti
- Nel mentre rimuovere il mezzo dalle cellule e aggiungere il volume di mezzo completo riportato in tabella 4
- Aggiungere la soluzione trasfettante goccia a goccia alla coltura cellulare
- Incubare per 6 ore in modo che avvenga il processo di trasfezione
- Dopo le 6 ore, sostituire la soluzione trasfettante con il mezzo di coltura completo

### 3.8 Metodi usati negli studi di biologia molecolare

#### 3.8.1 Estrazione dell' RNA totale

L'RNA totale viene estratto utilizzando materiali RF (*RNase-free*) per limitare la degradazione dell'RNA da parte dell'enzima RNase.

Il protocollo, prevede:

- Staccare le cellule in coltura attraverso tripsinizzazione e successivamente centrifugare a 1100 rpm per 5 minuti.
- Eliminare il surnatante e lavare il pellet per tre volte con PBS
- Procedere alla conta cellulare mediante la camera di Burker come descritto precedentemente
- Aggiungere al pellet il tampone RLT ricostituito (10µl beta-mercaptoetanol + 1 ml di buffer RLT non ricostituito) per indurre la lisi cellulare. Il volume di buffer RLT utilizzato dipende dal numero di cellule presenti nel campione, secondo la proporzione prevista dalle istruzioni del kit (Tab 5)

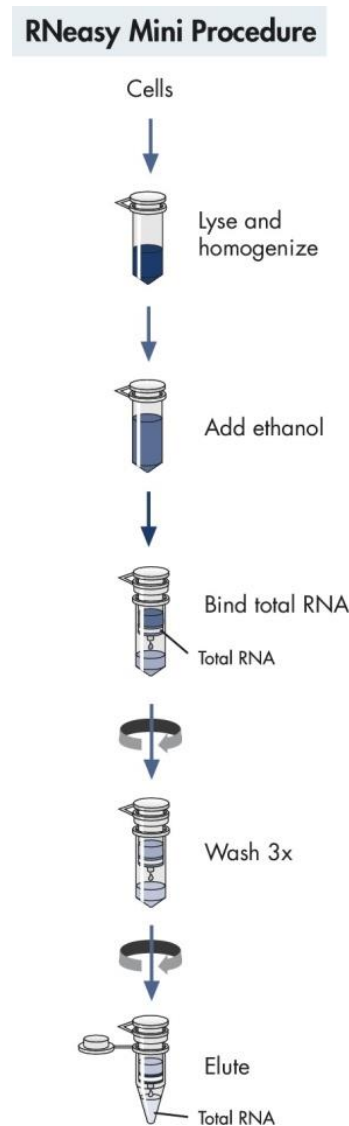
## Capitolo III

<i>Numero di cellule</i>	<i>Tampone RTL (<math>\mu</math>l)</i>	<i>Diametro del disco (cm)</i>	<i>Tampone RTL (<math>\mu</math>l)</i>
$n < 5 \times 10^6$	350	< 6	350
$5 \times 10^6 < n < 1 \times 10^7$	600	6 - 10	600

**Tabella 5** Volume di tampone RTL da utilizzare in base al numero di cellule o al supporto utilizzato

- Agitare la provetta con il tampone, aiutandosi con una bacchetta di vetro precedentemente pulita con il solvente RNaseZap, in modo da evitare la formazione di grumi e filamenti.
- Al lisato viene poi aggiunto un volume di etanolo RF 70% uguale al volume di tampone RTL utilizzato, agitando continuamente per evitare la formazione di due fasi.
- Caricare una quantità massima di 700  $\mu$ l di lisato per ogni spin column, che viene inserita in una provetta da 2 ml, e centrifugare per 1 minuto a 11000 rpm.
- Eliminare l'eluato e aggiungere 500  $\mu$ l di tampone RPE
- Centrifugare per 15 secondi a 11000 rpm ed eliminare nuovamente l'eluato.
- Caricare altri 500  $\mu$ l di tampone RPE e centrifugare per 2 minuti a 11000 rpm.
- Eliminare la provetta e aggiungere 40  $\mu$ l di acqua RNase-free sulla membrana della colonna, aspettare qualche minuto in modo che la resina contenente l'RNA da estrarre si idrati. Centrifugare per l'ultima volta a 11000 rpm per 1 minuto. L'eluato ottenuto contiene l'RNA per cui viene posto in ghiaccio (Fig.13).

Per determinare la purezza e la concentrazione dei campioni ottenuti si fanno misurazioni spettrofotometriche utilizzando il NanoQuant Infinite 2000 (TECAN, Salzburg, Austria) a due lunghezze d'onda: 260nm e 280nm. La purezza del campione è data dal rapporto tra le due assorbanze e il valore ottenuto deve essere compreso tra 1,8 e 2,0: più il rapporto si avvicina a 2, maggiore sarà la purezza dell'RNA estratto.



**Figura 13** Schema della procedura per l'estrazione dell' RNA (RNeasy MiniKit)

### 3.8.2 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è il processo mediante cui a partire dall'RNA estratto dalle cellule si sintetizza il cDNA.

La procedura prevede:

- L'RNA e i componenti del kit vengono scongelati e posti in ghiaccio
- Preparare la soluzione di eliminazione del DNA genomico (2  $\mu$ l di tampone gDNA Wipeout 7x, 1  $\mu$ l di RNA totale, acqua RNase Free q.b a 14  $\mu$ l) e porla in ghiaccio.
- Incubare i campioni per 2 minuti a 42°C nel termocicizzatore e poi porli nuovamente nel ghiaccio in modo da eliminare il DNA genomico dei campioni.

- Preparare la Reverse Transcription Master Mix (1 µl di QuantiScript Reverse Transcriptase, 4 µl di tampone QuantiScript RT 5x, 1 µl di RT Primer Mix) che viene aggiunta all'RNA totale.
- Incubare nel termocicizzatore con il seguente protocollo per attivare l'enzima QuantiScript Reverse Transcriptase: 30 minuti a 42°C; 3 minuti a 95°C; infinito a 4°C. I campioni di cDNA ottenuti verranno utilizzati per la realtime-PCR o verranno mantenuti a -20°C.

### 3.8.3 Real-time PCR

La realtime-PCR è stata utilizzata per quantificare l'espressione genica della survivina e, in base al protocollo suggerito dal produttore, si è proceduto nel seguente modo:

- Scongellare i primer forward e reverse, il cDNA, l'acqua e la sonda. I primer utilizzati sono specifici per la survivina e per il gene housekeeping che, nel nostro caso, è la  $\beta$ -actina.
- In ogni well si aggiungono:
  - 5 µl di sonda
  - 1 µl di primer forward 400 nM
  - 1 µl di primer reverse 400 nM
  - Caricare un volume di cDNA corrispondente a 50 ng
  - Acqua q.b. ad arrivare ad un volume totale di 10 µl
- Il protocollo della real-time PCR si compone delle seguenti fasi (Tab.6):

	Temperatura	Tempo	Cicli
<i>Attivazione polimerasi</i>	95°C	30 sec	1
<i>Denaturazione</i>	95°C	1-5 sec	40
<i>Curva di Melt</i>	65-95°C	5 sec	1

**Tabella 6** Protocollo di Real-time PCR.

La temperatura di annealing utilizzata per la survivina è di 59°C mentre quella per la  $\beta$ -actina è di 61°C. La real-time PCR è una tecnica che si basa sull'utilizzo di una molecola fluorescente, la quale aumenta la propria fluorescenza man mano che aumenta la quantità di amplificato che si forma; viene eseguita con strumenti che, oltre a funzionare da termocicizzatori, eccitano i fluorocromi presenti sui

campioni convogliando la fluorescenza emessa ad uno spettrografo. In questo studio è stata utilizzata la SYBR Green.

### 3.9 Metodi usati per l'analisi tramite Western Blotting

#### 3.9.1 Estrazione proteica

L'estrazione proteica viene eseguita per ottenere i lisati proteici da utilizzare per il western blotting. Il procedimento prevede:

- Scongellare i componenti del kit e preparare la soluzione di lisi aggiungendo 100  $\mu$ l di tampone di lisi Ripa, 1  $\mu$ l del cocktail inibitore delle proteasi e 1  $\mu$ l di sodio ortovanadato
- Dai dischi dove sono state seminate e trattate le cellule, si aspira il mezzo, si pongono in ghiaccio e si effettuano dei lavaggi con del PBS freddo. Successivamente si aggiunge la soluzione di lisi appena preparata.
- Staccare le cellule con lo scraper e trasferire la sospensione in una eppendorf che viene mantenuta in ghiaccio.
- Le eppendorf vengono poi sonicate per 5 secondi per quattro volte, alternando la sonicazione con dei passaggi nel ghiaccio. Il tutto viene poi incubato per 1 ora a 4°C.
- Centrifugare a 11000 rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante, che costituisce il lisato proteico, viene trasferito in un'altra eppendorf e conservata a -80°C.

#### 3.9.2 Quantizzazione proteica

Il metodo di Bradford per la quantizzazione delle proteine è una tecnica che serve per determinare la concentrazione delle proteine in una soluzione incognita. Consiste nell'aggiunta di un colorante acido alla soluzione proteica e successiva misurazione a 595 nm con uno spettrofotometro. I valori di assorbanza che si ottengono dalle misurazioni vengono poi interpolati in una retta di taratura da cui si ricava la concentrazione del campione.

Il procedimento prevede:

- Costruire la curva di taratura utilizzando soluzioni standard di  $\gamma$  globulina (Tab 7)
- Preparare le eppendorf, corrispondenti ai punti della retta, e riempirle con la quantità di acqua e reattivo di Bradford come mostrato in tabella 7
- Vortexare per miscelare il tutto e lasciar riposare per 10 minuti
- Trasferire il contenuto delle eppendorf in cuvette ed eseguire la lettura spettrofotometrica a 595 nm

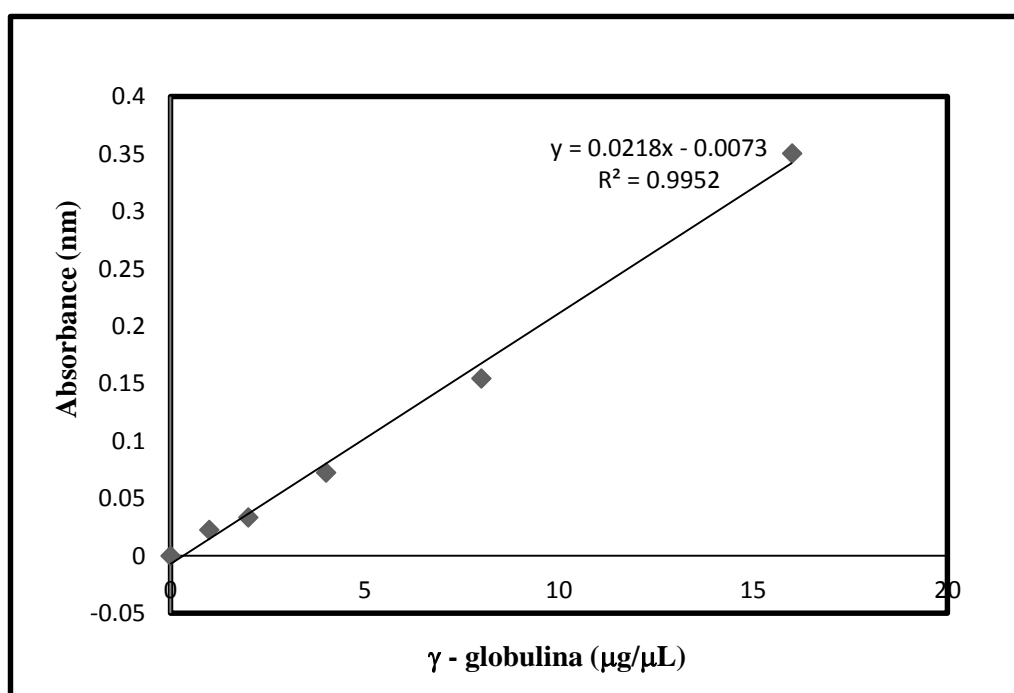
## Capitolo III

- Sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti nelle prove 2-3-4-5-6, il valore del bianco
- Graficare i valori di assorbimento ottenuti con le rispettive concentrazioni

$\gamma$ globulina mg/mL)	(0.1	H <sub>2</sub> O (mL)	Bradford ( $\mu$ L)
0 (Bianco)		0.800	200
0.01		0.790	200
0.02		0.780	200
0.04		0.760	200
0.08		0.720	200
0.16		0.640	200

**Tabella 7** Quantità di reagenti per la costruzione della retta di taratura

- Preparare i campioni incogniti aggiungendo in eppendorf 10  $\mu$ l di campione + 790  $\mu$ l di acqua + 200  $\mu$ l di Bradford
- Vortexare e lasciar riposare per 10 minuti
- Trasferire il contenuto delle eppendorf nelle cuvette ed eseguire la lettura a 595 nm



**Figura 14** Retta di taratura con  $\gamma$  globulina.

Per determinare la concentrazione incognita si sottrae il valore del bianco al valore di assorbanza dei campioni e si calcola la media. Si interpola tale valore sulla retta di calibrazione (Fig 14) e si determina la concentrazione incognita.

### 3.9.3 Western Blotting

Il western blot è una tecnica che consente di valutare semi-quantitativamente le proteine separate mediante elettroforesi grazie al riconoscimento con anticorpi specifici.

La prima parte della tecnica prevede la separazione delle proteine mediante la procedura di SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilamide). La corsa elettroforetica avviene quindi su gel di poliacrilamide, in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) che è un composto denaturante in quanto si lega alle proteine e distrugge i legami a idrogeno e i ponti disolfuro portando alla perdita della struttura secondaria e/o terziaria delle proteine. Questo passaggio è molto importante in quanto si formano complessi proteina-SDS che si separano tra loro solo in funzione della massa.

Per eseguire la corsa elettroforetica sono stati utilizzati due gel (Tab.8):

- Stacking gel: permette di posizionare concentrare i campioni nei pozzetti, affinché questi possano cominciare la corsa dallo stesso livello
- Resolving gel: ha la funzione di separare le proteine in base al loro peso molecolare

	Stacking gel 4%	Resolving gel 12%
Acqua	3.05 ml	3.40 ml
Stacking o Resolving buffer	1,25 ml	3,10 ml
Soluzione SDS 10%	50 µl	100 µl
Acrilammide/bisacrilammide 30	650 µl	4 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS	50 µl	100 µl

**Tabella 8** Sostanze e relative quantità per la preparazione dei gel.

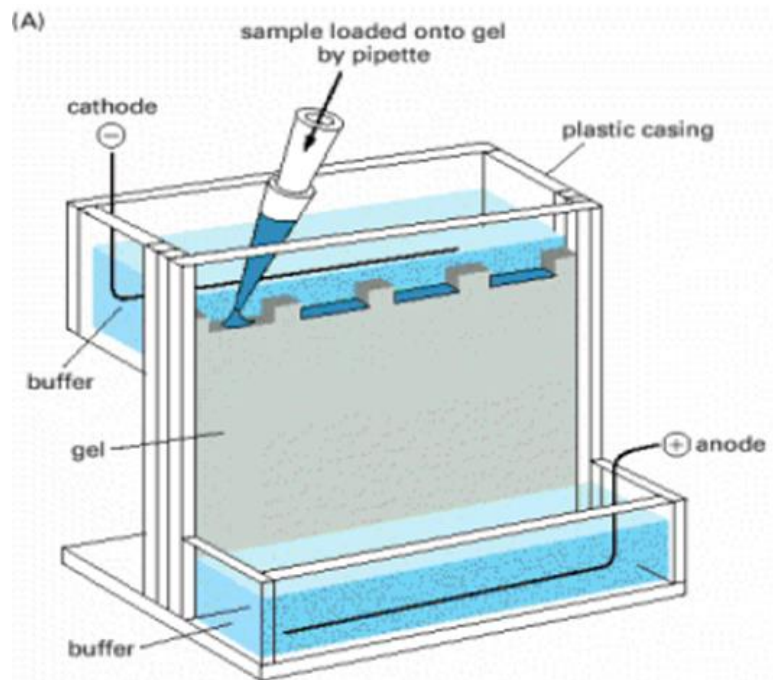
Il protocollo prevede:

- Preparare i tamponi:
  - Tampone resolving costituito da tris base 1,5 M diluito in acqua milliQ. pH=8,8
  - Tampone stacking costituito da tris base 0,5 M diluito in acqua milliQ. pH=6,8.



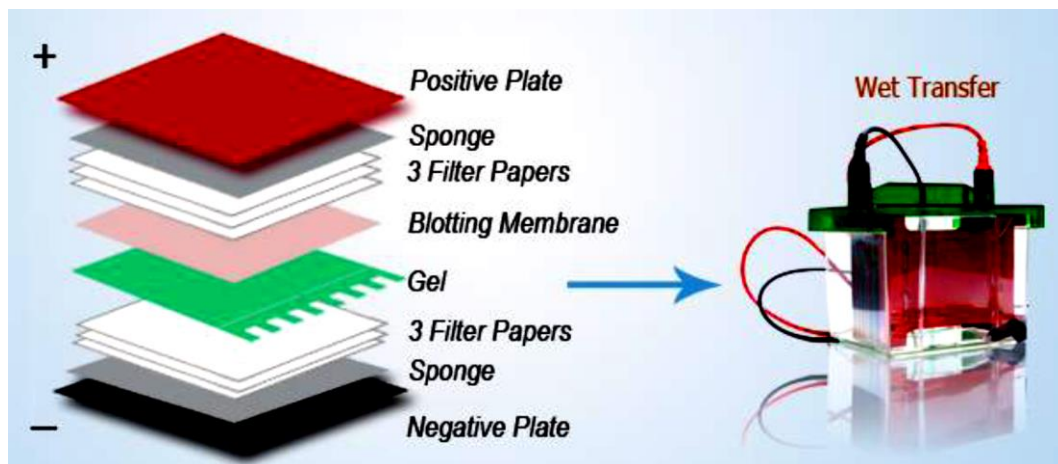
## Capitolo III

- Tampone di corsa: TRIS 25 mM, 0.01% SDS e glicina 192mM; pH=8,3
  - Soluzione di blotting: TRIS 25mM, SDS 0,1%, metanolo 20%, 192 mM glicina; pH 8,3
  - Laemly 3x: 1,25 ml Tris 0.5 M + 0.23 gr SDS + 0.5 ml acqua + 1 ml glicerolo + 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoetanolo + blu di bromofenolo in tracce
  - Latte 1%: 0.5 gr latte senza grassi in 50 ml di TBS-Tween 0.1%
  - Latte 5%: 2.5 gr latte senza grassi in 50 ml di TBS-Tween 0.1%
  - TBS-Tween 0.1%: 450 ml acqua + 50 ml TBS 10x + 500  $\mu$ l Tween 20
- Preparare i gel seguendo le indicazioni contenute in tabella 8. Mantenere la miscela in agitazione finché non si aggiungono i due catalizzatori, APS ed TEMED.
  - Trasferire la miscela del gel resolving nel mezzo dei due vetrini, coprire con acqua ed aspettare la gelificazione. Quando il primo gel ha gelificato rimuovere l'acqua e aggiungere anche la miscela del gel stacking, inserire il pettine per formare i pozzetti ed attendere la gelificazione.
  - Trasferire il gel nella camera di elettroforesi ed immergerlo nel tampone di corsa. Nel frattempo, prelevare il volume di lisato proteico equivalente alla quantità di proteine che si vuole caricare (80  $\mu$ g), addizionarci la soluzione Laemly 3x e far bollire per 5 minuti.
  - Al termine dei 5 minuti caricare i campioni e lo standard nei pozzetti. I pozzetti rimasti vuoti vengono riempiti con la soluzione Laemly 3x nello stesso volume dei campioni (Fig 15).
  - Chiudere la camera e far partire la corsa elettroforetica: 90mA per 10 minuti e poi aumentare a 110 mA fino a fine corsa



**Figura 15** Schema SDS-PAGE

- A metà della corsa mettere un pezzo di membrana di nitrocellulosa in bagno nella soluzione di blotting
- Al termine della corsa procedere alla preparazione del “sandwich” come riportato in fig. 16 stando attenti a non formare bolle d’aria che possono interferire durante il trasferimento.
- Posizionare il sandwich all’interno della camera di trasferimento immerso nella soluzione di blotting freddo e dare inizio al processo di trasferimento (350 mA per 60 minuti a 4°C) (Fig 17)

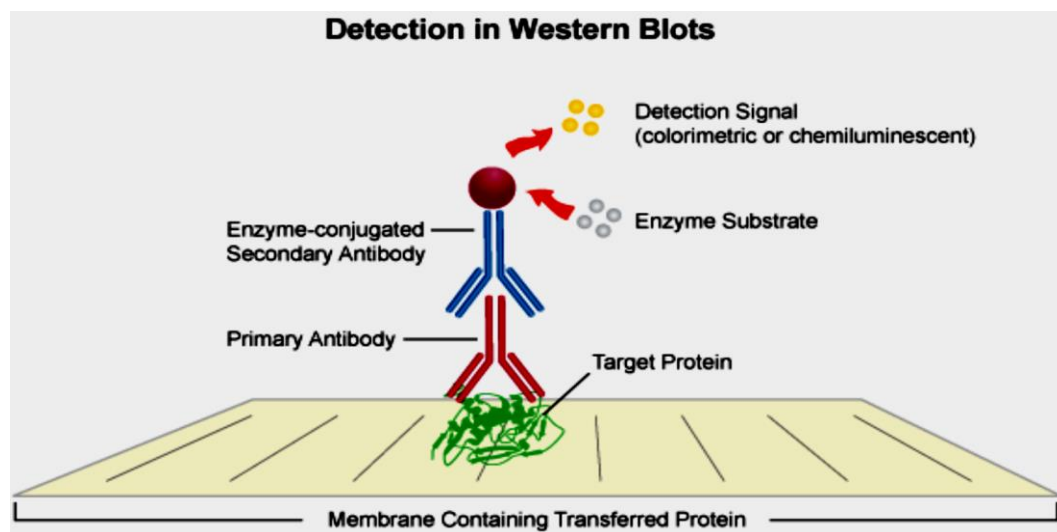


**Figura 16** Componenti del sandwich e camera di trasferimento.

- Al termine del trasferimento, porre la nitrocellulosa in un contenitore e procedere alla fase di blocking utilizzando latte al 5% in modo da bloccare tutti i siti aspecifici della membrana di nitrocellulosa per 45 minuti.

## Capitolo III

- Preparare la soluzione diluita di anticorpo primario per la  $\beta$ -actina (diluizione 1:5000), per la survivina (diluizione 1:200) per ERK (diluizione 1:200) e per p-ERK (diluizione 1:500) in soluzione di blocking all'1% (1 gr no-fat milk in 100 ml TBS-Tween 0.1%). Lasciare incubare su una bascula per una notte a 4°C.
- La mattina successiva, effettuare 3 lavaggi ciascuno di 5 minuti con TBS-Tween 0.1% in modo da eliminare l'anticorpo primario non legato
- Successivamente aggiungere la soluzione di anticorpo secondario specifico diluito 1:5000 e lasciare incubare per due ore (Fig.17).
- Al termine delle 2 ore effettuare 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con TBS-Tween 0.1%



**Figura 17** Rappresentazione del trattamento della nitrocellulosa con anticorpo primario e secondario.

- Eseguire lo sviluppo della membrana di nitrocellulosa. Al riparo dalla luce versare goccia a goccia la soluzione luminescente ECL preparata mescolando il reagente A con il reagente B in rapporto 1:1.
- Porre la membrana nello strumento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) e attendere lo sviluppo dell'immagine in cui saranno visualizzate le bande relative alle proteine d'interesse.
- Eseguire l'analisi densitometrica delle bande utilizzando il software ImageJ

### 3.10 Metodi usati nello studio della vitalità cellulare

#### 3.10.1 Rosso neutro

Il rosso neutro è un colorante lisosomiale utilizzato per valutare la proliferazione cellulare.

Il protocollo prevede:

- Seminare 3500 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti
- Dopo 24 ore procedere al trattamento. Nel nostro studio le cellule sono state trattate con il siR-scramble, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM.
- Dopo le 6 ore di trasfezione, cambiare il mezzo e sostituirlo con 100  $\mu$ l di mezzo completo per 48 ore
- Al termine del trattamento, aggiungere la soluzione di rosso neutro 0,33% in DPBS in quantità pari al 10% del mezzo di coltura (nel nostro caso 10  $\mu$ l).
- Riporre la piastra nell'incubatore per 2 ore.
- Al termine del tempo di incubazione, aspirare il mezzo con il colorante, lavare con PBS i vari pozzetti e aggiungere la soluzione di solubilizzazione in quantità uguali a quelle di mezzo di coltura iniziale (100  $\mu$ l).
- Posizionare la piastra sull'agitatore a temperatura ambiente per 10 minuti.
- Eseguire la lettura allo spettrofotometro a 540 nm.

### 3.10.2 Valutazione della capacità di formazione delle colonie

Il saggio della capacità di formazione delle colonie è un metodo che valuta la capacità delle cellule di crescere, proliferare e formare colonie.

Il protocollo prevede:

- Seminare 500 cellule per pozzetto in una piastra da 6
- Dopo 24 ore procedere al trattamento. Nel nostro studio le cellule sono state trattate con il siR-scramble, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM.
- Dopo le 6 ore di trasfezione, cambiare il mezzo e sostituirlo con 2,5 ml di mezzo completo. Non effettuare nessun cambio mezzo per i 10 giorni seguenti.
- Dopo 10 giorni, togliere la piastra dalla incubatore. Lavare con PBS i pozzetti.
- Aggiungere 1 ml di metanolo freddo per pozzetto e mettere la piastra a -20°C per 20 minuti.
- Aspirare il metanolo e mettere in ogni pozzetti un volume di cristal violetto 0,5% sufficiente a coprirne l'intera superficie.
- Mettere la piastra sulla bilancia per alcuni minuti
- Lavare bene con acqua e lasciar asciugare.
- Contare il numero colonie.

### 3.11 Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati e per le rappresentazioni grafiche, è stato utilizzato il software Graph-Pad Prism 6 (Graph-Pad). La densità ottica delle bande ottenute da analisi Western Blot è stata misurata utilizzando il software Image J.

## Capitolo III

Tutti i dati rappresentano la media  $\pm$  della deviazione standard di dati ottenuti da tre distinti esperimenti. Per verificare se i dati ottenuti fossero significativamente diversi, abbiamo utilizzato il test statistico Student t-test e ANOVA con post-test Bonferroni.

## Capitolo IV

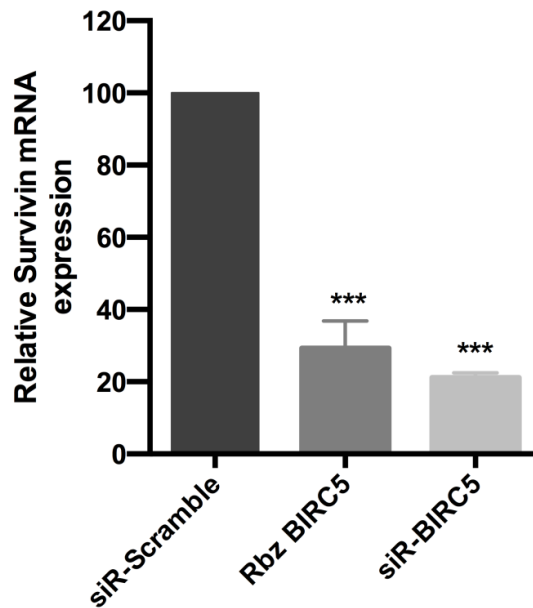
### Risultati e Discussione

#### 4.1 Valutazione dell'espressione genica e proteica della survivina dopo trattamento con ribozima hammerhead (Rbz-BIRC5) e siRNA (siR-BIRC5)

Le cellule A375 di melanoma cutaneo sono state trattate con il siR-*Scramble*, il Rbz-BIRC5 e il siR-BIRC5, alla concentrazione 100 nM per 48 ore. La concentrazione 100 nM è stata scelta sulla base di esperimenti preliminari nel range 10-100 nM in cui abbiamo osservato un silenziamento proteico concentrazione-dipendente dopo un confronto con cellule trattate con il solo trasfettante. Tale concentrazione è inoltre uguale a quella precedentemente usata nel laboratorio in cui è stata realizzata la presente tesi, con un altro agente silenziante la survivina, sempre in cellule di melanoma cutaneo umano A375 (Carpi et al. 2014). La tempistica per lo studio del silenziamento (48h dopo la trasfezione) è stata scelta sapendo che la trasfezione transiente può essere monitorata tra le 12 e le 72 ore poiché dopo 72 ore il rischio di perdita/estrusione da parte della cellula del costrutto transfettato è molto alto (Hutzingner, 2001).

Dopo il trattamento abbiamo proceduto inizialmente all'estrazione dell'RNA totale da cellule di melanoma cutaneo A375 secondo il protocollo descritto in “Materiali e Metodi” e i campioni ottenuti sono stati analizzati con lo spettrofotometro NanoQuant Infinite M200 (Tecan, Salzburg, Austria). I campioni ottenuti hanno mostrato un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  pari a 2.0, indice di un buon grado di purezza dell'RNA estratto. Tale RNA è stato poi retro-trascritto in cDNA, secondo la procedura descritta nel capitolo “Materiali e Metodi” ed è stato utilizzato nella reazione di real-time PCR per valutare i livelli di espressione del target in studio, survivina, rispetto alla  $\beta$ -actina, gene *housekeeping*, usato come controllo.

L'analisi dei risultati di real-time PCR mostra una significativa riduzione dei livelli di mRNA codificante per la survivina a 48 ore dalla trasfezione con Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM (Fig 18) rispetto alle cellule transfettate con il controllo, il siR-*Scramble* 100 nM.

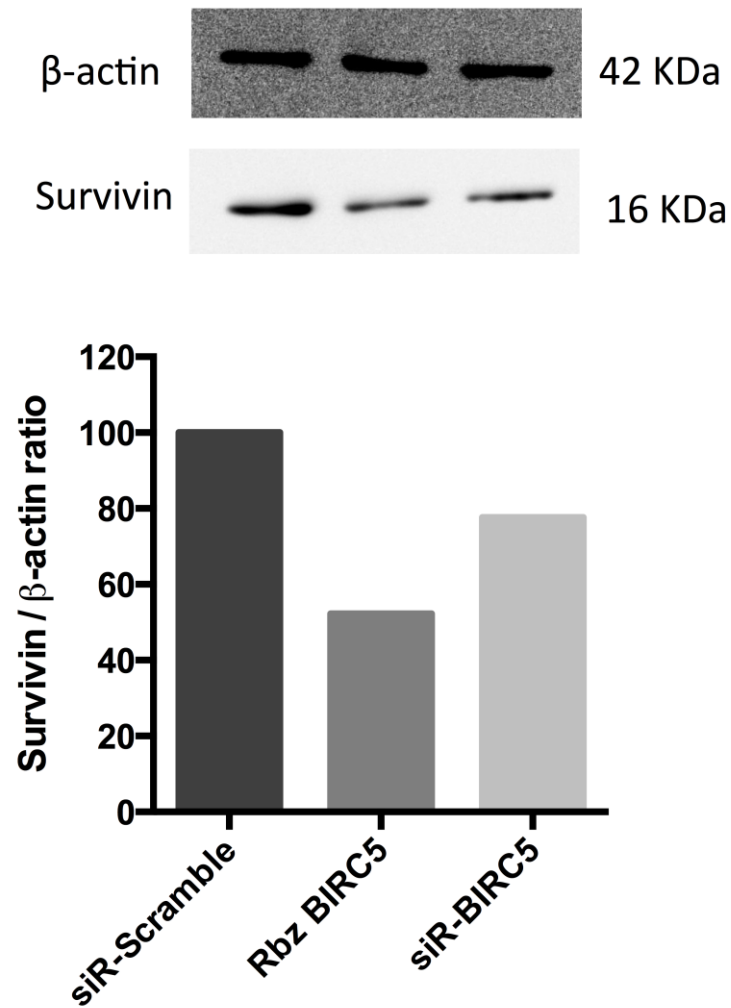


**Figura 18** Espressione della survivina rispetto alla  $\beta$ -actina eseguita con real-time PCR su cDNA ottenuto da cellule di melanoma A375 trattate con siR-*Scramble*, Rbz BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM per 48 ore (\*\*\*  $p < 0,001$ , one-way ANOVA, Bonferroni post test).

Dopo 48 ore di trasfezione, il Rbz-BIRC5 ha portato ad una riduzione dell'espressione della survivina del  $70,72\% \pm 4,35$ , mentre il siR-BIRC5 del  $78,84\% \pm 0,77$  rispetto alle cellule trasfettate con il controllo alla stessa concentrazione e tempo, siR-*Scramble*. In base a questi dati, si è constatato che il Rbz-BIRC5 e il siR-BIRC5 sono in grado di ridurre in maniera significativa l'espressione dei livelli di mRNA codificanti per la survivina. Abbiamo, quindi, proseguito valutando gli effetti di questi trattamenti sui livelli proteici del target survivina.

I livelli di espressione della proteina survivina nelle cellule A375 sono stati analizzati mediante procedura di Western blotting e le bande ottenute dallo sviluppo della membrana di nitrocellulosa sono state analizzate con densitometria utilizzando il software ImageJ come riportato nella sezione di "Materiali e Metodi".

L'espressione proteica della survivina, analogamente a quanto realizzato con l'mRNA, è stata valutata a 48 ore dal trattamento con siR-*Scramble*, Rbz BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM, usando, come controllo interno, la  $\beta$ -actina per normalizzare i risultati. Le bande ottenute dopo lo sviluppo della nitrocellulosa, mostrano una banda a circa 16.5 KDa dovuta al legame dell'anticorpo anti-survivina con la proteina bersaglio e una banda a 42 KDa dovuta al legame della  $\beta$ -actina con l'anticorpo specifico (Fig. 19, in alto). L'analisi densitometrica di tali bande (Fig. 19, in basso), normalizzate sul siR-*Scramble* di controllo, mostra come il trattamento con Rbz-BIRC5 sia in grado di indurre un abbattimento dei livelli di espressione della survivina a 48 ore di circa il 47%. Il livello di silenziamento indotto dal siR-BIRC5 appare inferiore ( $\pm 22\%$ ) rispetto a quello indotto da Rbz-BIRC5, dobbiamo però considerare che questi dati derivano da un solo dato sperimentale finora realizzato.



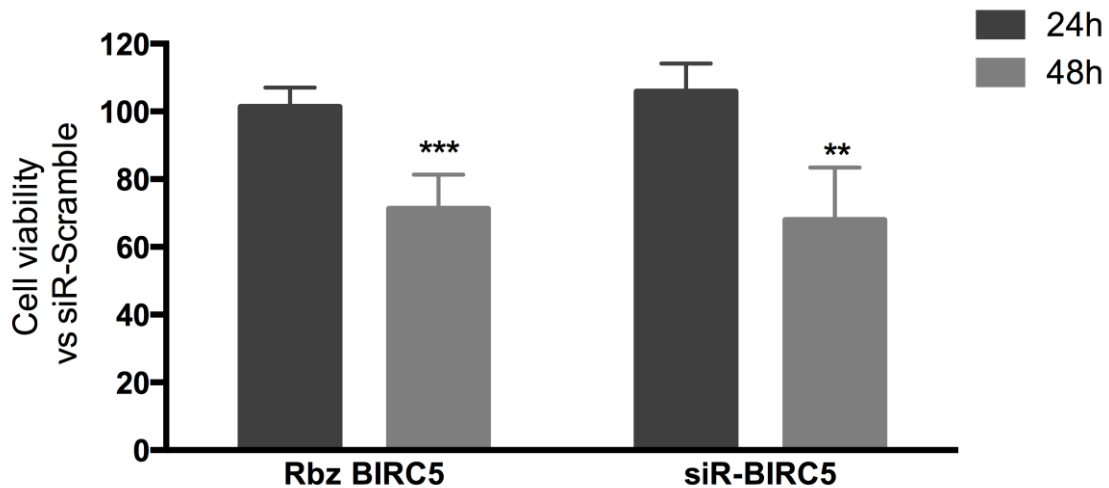
**Figura 19** Western blotting su lisato proteico ottenuto da cellule di melanoma cutaneo A375 trattate con siR-*Scramble*, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM per 48 ore. In alto: bande relative all'espressione della  $\beta$ -actina (42 KDa) e della survivina (16.5 KDa). In basso: analisi densitometrica dell'espressione della survivina normalizzata su  $\beta$ -actina rispetto al siR-*Scramble*.

Sebbene siano da confermare, aumentando il numero di esperimenti, anche questi dati sembrano, dunque, confermare una buona attività silenziante del Rbz-BIRC5. Questi dati sono in linea con diversi studi. Cellule di melanoma JR8 sono state trasfettate stabilmente con un plasmide codificante per un ribozima anti-survivina osservando una riduzione dei livelli proteici del target del  $60 \pm 8\%$  rispetto alle cellule trasfettate con un plasmide codificante per una ribozima *Scrambled* (Pennati et al., 2004). In un altro studio sempre condotto da Pennati e collaboratori, due diverse linee cellulari di tumore prostatico (DU145 e PC-3) sono state trasdotte con adenovirus codificante per un ribozima anti-survivina. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'espressione proteica della survivina del  $90\% \pm 8\%$  nella linea cellulare DU145 e del  $68\% \pm 5\%$  nella linea cellulare PC-3 (Pennati et al., 2004).



### 4.2 Valutazione della vitalità cellulare dopo trattamento con ribozima hammerhead (Rbz-BIRC5) e siRNA (siR-BIRC5)

Le cellule A375 sono state trattate con *siR-Scramble* e Rbz-BIRC5 100 nM per 24 e 48 ore. Al termine del trattamento abbiamo proceduto al saggio del rosso neutro, come riportato nella sezione “Materiali e Metodi” per valutare il numero di cellule vive rispetto al controllo, *siR-Scramble*.



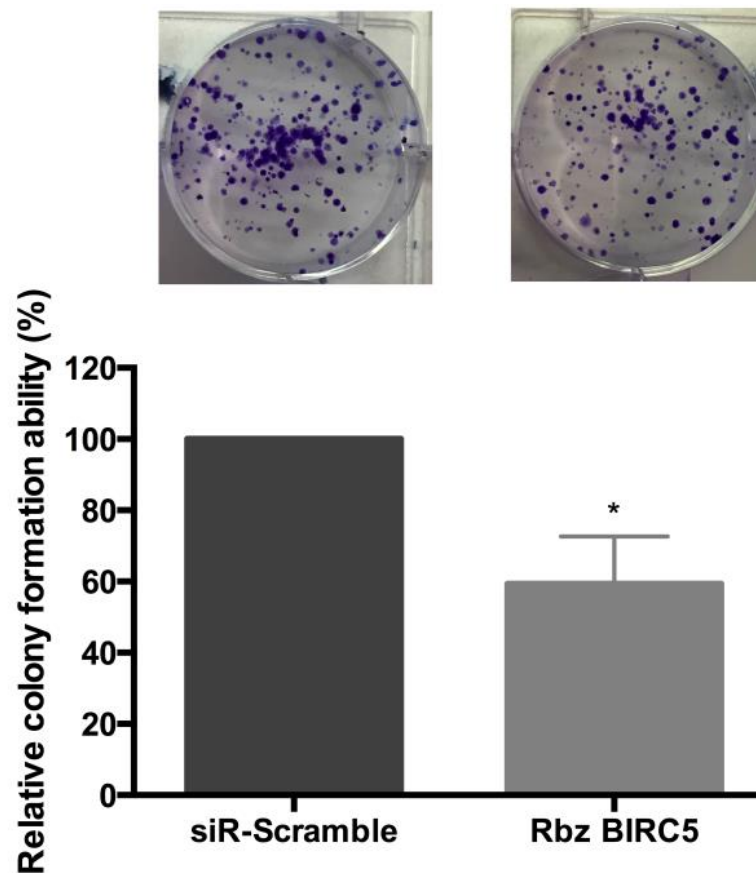
**Figura 20** Vitalità cellulare in cellule di melanoma A375 trattate con *siR-Scramble*, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM dopo 24 e 48 ore. *Student t* test rispetto al trattamento a 24 ore (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Come si può vedere dal grafico riportato in Fig.20 dopo 24 ore dalla trasfezione, la vitalità cellulare non risulta modificata né dal trattamento con il Rbz-BIRC5 né con il siR-BIRC5. Dopo 48 ore possiamo osservare, invece, una riduzione statisticamente significativa della vitalità, rispettivamente del  $28,73\% \pm 4,11$  con il Rbz-BIRC5 e del  $32,02\% \pm 6,90$  con il siR-BIRC5.

### 4.3 Valutazione della capacità di formare colonie dopo trattamento con ribozima hammerhead (Rbz-BIRC5)

Il saggio di formazione delle colonie (*colony forming assay*) permette di quantificare la capacità proliferativa e di formare colonie delle cellule tumorali. Questo saggio permette di valutare la condizione delle cellule dopo un tempo maggiore rispetto a quello già valutato con il saggio del rosso neutro.

Le cellule A375 trattate con *siR-Scramble* e Rbz-BIRC5 100 nM sono state incubate per 10 giorni. Al termine del periodo di incubazione, sono state fissate e colorate con cristal violetto come riportato nella sezione “Materiali e Metodi”.



**Figura 21** Capacità di formazione delle colonie in cellule di melanoma A375 trattate con siR-*Scramble* e Rbz-BIRC5 100 nM dopo 10 giorni. In alto: immagini rappresentative del saggio; in basso: percentuale relativa al numero di colonie rispetto al controllo siR-*Scramble* (\*  $P < 0,05$  Student *t* test).

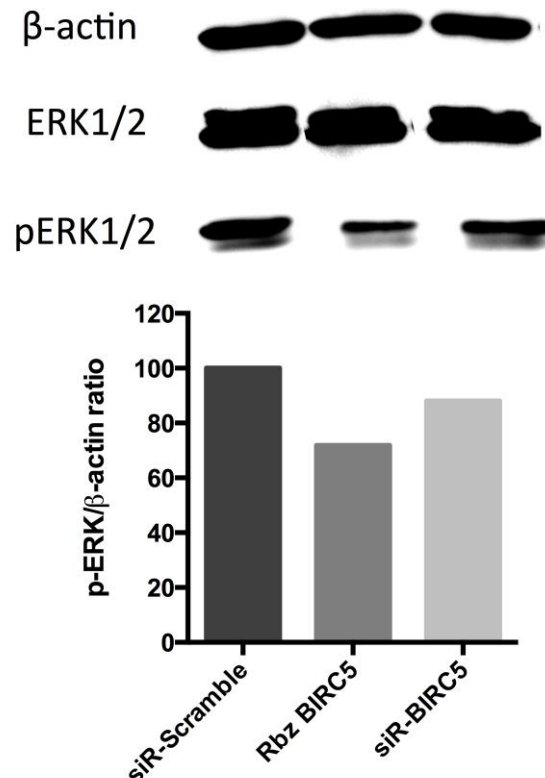
Come mostrato in Fig. 21, le cellule trattate con Rbz-BIRC5 hanno mostrato una minore capacità di formare colonie rispetto al controllo (cellule trattate con il siR-*Scramble*). Il trattamento con Rbz-BIRC5 ha ridotto il numero di colonie del  $40,7\% \pm 9,47$ . Questa riduzione è paragonabile a quella ottenuta nel saggio del rosso neutro dopo 48 ore e ci conferma che la riduzione dell'espressione della survivina, se pur con trasfezione transiente, è in grado di influenzare la proliferazione cellulare nel lungo periodo.

#### 4.4 Valutazione dei livelli di fosforilazione di ERK dopo trattamento con ribozima hammerhead (Rbz-BIRC5) e siRNA (siR-BIRC5)

Le cellule A375 di melanoma cutaneo sono state trattate con siR-*Scramble*, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM per 48 ore.

I livelli di espressione delle proteine ERK1 e 2 (*extracellular signal-regulated kinases*) e pERK1 e pERK 2 nelle cellule A375 sono stati analizzati mediante procedura di Western blotting e le bande ottenute dallo sviluppo della membrana di nitrocellulosa sono state analizzate con densitometria utilizzando il software ImageJ come riportato nella sezione di “Materiali e Metodi”.

Le bande ottenute dopo lo sviluppo della nitrocellulosa, mostrano una banda a circa 44 KDa e una a 42 KDa dovute rispettivamente al legame dell'anticorpo anti-ERK1/2 con le proteina ERK1 e ERK2. Una doppia banda alla medesima altezza è osservabile dopo legame con l'anticorpo che si lega alla Tirosina 204 fosforilata di ERK. Infine la banda a 42 KDa è dovuta al legame dell'anticorpo specifico con la proteina  $\beta$ -actina (Fig. 22, in alto). L'analisi densitometrica di tali bande (Fig. 22, in basso) normalizzate sul controllo siR-*Scramble*, mostra come il trattamento con Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 induca una riduzione dei livelli di fosforilazione della proteina ERK (rispettivamente del 22 % e 15%).



**Figura 22** Western blotting su lisato proteico ottenuto da cellule di melanoma cutaneo A375 trattate con siR-*Scramble*, Rbz BIRC5, siR-BIRC5 100 nM a 48 ore. In alto: bande relative all'espressione della  $\beta$ -actina (42 KDa) e della proteina p-ERK 1/2 (44/42 KDa). In basso: analisi densitometrica percentuale di p-ERK 1/2 normalizzata su  $\beta$ -actina.

Ad oggi diversi studi riportano come ERK e AKT modulino i livelli di espressione proteica della survivina (Ye et al., 2014; Hosseinimeher et al., 2004; Jeong et al., 2009) anche se non vi sono studi che suggeriscono il coinvolgimento della survivina nella modulazione di ERK.

### Capitolo V

### Conclusioni

I dati ottenuti dal presente lavoro di tesi mostrano per il ribozima in studio una buona attività silenziante, paragonabile a quella del siRNA ottenuto commercialmente e all'oligonucleotide già sperimentato precedentemente da Carpi e collaboratori (2014).

L'attività di silenziamento genico della survivina è in grado di modificare la vitalità cellulare e di indurre un effetto anti-proliferativo che si mantiene nel tempo.

In presenza di ribozima si riduce la fosforilazione di ERK, rivelando che la survivina svolge un ruolo di controllo su questa via di segnale, importante nella proliferazione delle cellule di melanoma e già target di farmaci a bersaglio molecolare utilizzati nella terapia del melanoma, quali gli inibitori B-Raf e MEK.

Potrà essere dunque interessante, in studi futuri valutare una possibile forma di sinergismo da parte del ribozima nei confronti di farmaci di nuova generazione quali vemurafenib (B-Raf inibitore) e trametinib (MEK inibitore).

## Bibliografia

Adida, C, Crotty PL, McGrath J., Berrebi D, Diebold J., Altieri DC., 1998. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *American journal of pathology* 152, pp. 43-49.

Altieri DC, 2001 The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* pp 542-7.

Altieri DC., 2006 The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol.* pp 609-615

Altieri, D. C., 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature reviews cancer*, pp. 61-70.

Altieri DC, 2010 Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem Journal*, pp 199-205

Berinstein NL, Karkada M, Morse MA, Nemunaitis JJ, Chatta G et al., 2012 First-in-man application of a novel therapeutic cancer vaccine formulation with the capacity to induce multi-functional T cell responses in ovarian, breast and prostate cancer patients. *J Transl Med.*

Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene* 2003;2242:6579–88.

Bolhassani, A. 2011 Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 232–246

Canny M.D., Jucker F.M., Kellogg E., Khvorova A., Jayasena S.D., Pardi A., 2004. Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *J. Am.Chem.Soc.*, pp 126:10848-10849.

Carpi S, Fogli S, Giannetti A, Adinolfi B, Tombelli S, et al., 2014, Theranostic Properties of a Survivin-Directed Molecular Beacon in Human Melanoma Cells. *Plos One*

Carrasco, R., Stamm NB, Marcusson E, Sandusky G, Iversen P, et al., 2011 Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol. Cancer Ther.* 10, 221–232

Cech T.R.,1990. Self-splicing of group I introns. *Annu.Rev.Biochem.*, 59:543-568.

## Bibliografia

Chapuis A, Thompson JA, Margolin KM, Rodmyre R, Lay IP, et al., 2012. Transferred melanoma-specific CD8+ T cells persist, mediate tumor regression, and acquire central memory phenotype. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 4592-4597

Citti L., Rainaldi G., 2005. Synthetic hammerhead rybozimes as therapeutic tools to control disease genes. *Current Gene Therapy*, pp 5:11-24

Clinicaltrials.gov.Aviable:[<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00021021?term=Ribozyme&rank=4>] Accessed January 19, 2016

Dence, C. et al. 2010 Radiochemical synthesis, rodent biodistribution and tumor uptake, and dosimetry calculations of [<sup>11</sup>C] methylated LY2181308. *Mol. Imaging Biol.* 12, 608–615

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC, 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The journal of clinical investigation* 114, pp. 1117-1127.

Dohi T, Xia F, Altieri DC., 2007 Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell*, pp 17-28

Dunphy FR, Dukelow KK. Provenzal JandCrawford J, 2004 Phase I clinical results of intralesional injection of tetra-O-methyl nordihydrogualaretic acid (M4N) in refractory head and neck cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*.

Engeland CE., Grossardt C., Veinalde R, Bossow S, Lutz D, et al., 2014, CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol. Ther.* 22, pp 1949-1959

Ferraros, C. et al. 2011 Inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/ 2-targeted therapies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 41–419

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, et al., 2012 Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* pp 107-114

Fondazionemelanoma.org.Aviable:[<http://www.fondazionemelanoma.org/melanoma-epi.php>] Accessed January 22, 2016

Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, et al., 2004 Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol.* pp 179-191

Goetz MP, Toft D, Reid J, Ames M, Stensgard B, et al., 2005 Phase I Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Patients With Advanced Cancer. *Journal of clinical oncology*

## Bibliografia

- Groner, B. & Weiss, A., 2014. Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs*, pp. 27-39
- Grossman D., McKenzie JA., 2012 Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. *Anticancer Resarch*. pp 397-404.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000 The Hallmarks of Cancer. *Cell*; pp 57-70
- Hanuma Kumar Karnati et al., 2014. Therapeutic potential of siRNA and DNazymes in cancer. *Tumour Biol*. pp 9505-9521
- Hartman LM. & Czyz M., 2013. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer letters*, pp. 24-34
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, et al., 2012, Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380, pp 358-365
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, et al., 2010 Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl. J. Med*, pp363, 711-723
- Hosseiniher S.J., Inanami O., Hamasu T., Takahashi M., Asanuma T., et al., 2004, Activation of C-Kit by Stem Cell Factor Induces Radioresistance to Apoptosi through ERK-dependent Expression of Survivin in HL60 Cells. *J. Radiat. Res*. Pp 557-561
- Hutzingher O., 2001, The handbook of enviromental chemistry. Volume L.
- Jeong J.C., Kim M:S:, Kim T.H., Kim Y.K., 2009, Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivn in human glioma cells. *Neurochem Res*. pp 991-1001
- Kanwar J.R., Sishir K.K., et al., 2012 Survivin signaling in clinical oncology: a multifaceted dragon. *Medicinal Research Reviews*
- Kelly R.J, Lopez-Chavez A, Citrin D, Janik JE, Morris JC, 2011. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Molecular cancer*, pp. 10-35.
- Kelly R.J, Thomas A, Rajan A, Chun G, Lopez-Chavez A, et al., 2013 A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. pp 2601-2606
- Knauer SK, Mann W, Stauber RH, 2007 Survivin's dual role: an export's view. *Cell cycle*, pp 518-521

## Bibliografia

Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liszkay G, et al., 2014, Comined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N: Engl. J. Med.* pp 371, 1867-1876

Lennerz V, Gross S, et al., 2014 Immunologic response to the survivin-derived multi-epitope vaccine EMD640744 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* pp 381-394.

Mansour, M. et al. 2007 Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax1. *Transl. Med.* 5,20–27

Martick M. and Scott W.G., 2006. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, pp 126:309-320.

Mehrotra, S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC, 2010. IAP regulations of metastasis. *Cancer cell* 17, pp. 53-64.

Mejia, P. and Aguayo, C. 2011 Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane-resistant ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 3716–3726

Mirza A., McGuirk M., Hockenberry T.N., Wu Q., Ashar H., et al., 2002 Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21, pp 2613-2622

Mita A.C., Mita M.M., Nawrocki S.T., Giles F.J., 2008 Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin cancer res* 14, pp 5000-5005

Mitsuyasu RT, Merigan TC, Carr A, Zack JA, Winters MA, et al., 2009. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells; *Nat Med.* pp 285-292.

Morrow PK, Murthy RK, Ensor JD, Gordon GS, Margolin KA, et al., 2012 An open-label, phase II trial of RPI.4610 (Angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* pp 4098-4104

NCCN Guidelines Available:[[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/melanoma.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/melanoma.pdf)] Accessed February 25, 2016

Otto K., Andersen M, Eggert A, Keikavoussi P, Pedersen LØ, et al., 2005. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine*, pp. 884-889

Park, E, Gang EJ, Hsieh YT, Schaefer P, Chae S, et al. 2011 Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 2191–2199



## Bibliografia

- Pennati M., Binda M., De Cesare M., Pratesi G., Zaffaroni N., et al., 2004, Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* pp 1129-1136
- Pennati M, Binda M., Colella G., Zoppe M., Folini M., et al., 2004, Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* pp 386-394
- Phan GQ., Rosenberg SA, 2013, Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 20, pp 289-297
- Raetz EA, Morrison D, Romanos-Sirakis E, Gaynon P, Sposto R, et al., 2014 A phase I study of EZN-3042, a novel survivin messenger ribonucleic acid (mRNA) antagonist, administered in combination with chemotherapy in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): a report from the therapeutic advances in childhood leukemia and lymphoma (TACL) consortium. *J Pediatr Hematol Oncol.* pp 458-463
- Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. A Systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 pp 1535–44.
- Richardson, PG, Chanan-Khan AA, Alsina M, Doss D, Landrigan B, et al., 2005 Safety and activity of KOS-953 in patients with relapsed refractory multiple myeloma (MM): interim results of a phase 1 trial. *Blood*, 106, 152–153
- Richardson PG, Chanan-Khan A, Lonial S, Krishnan A, Carroll M, Alsina M, Albitar M, Berman D, Kaplita S, Anderson KC. Tanespimycin + bortezomib in patients with relapsed and refractory multiple myeloma: final results of a phase 1/2 study. *Journal of Clinical Oncology*, 2009
- Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, et al., 2015, Pembrolizumab versus Ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* pp 2521-2532
- Rosenberg SA., Restifo NP., 2015, Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.* pp 348, 62-68
- Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ, 2009 Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* pp 553-562
- Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, et al., 2015 Pooled analysis of long term survival data from phase II and phase III trials of Ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* pp 1889-1894

## Bibliografia

Senzer NN., Kaufman HL., Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, et al., 2009. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 27, pp 5763-5771

Singh N, Krishnakumar S, Kanwar RK, Cheung CH, Kanwar JR., 2015 Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers. *Drug Discov Today*, pp 578-587

Siomi H and Siomi MC, 2009 On the road to reading the RNA-interference code; *Nature*, pp 396-404

Symons RH, Hutchins CJ, Forster AC, Rathjen PD, Keese P, Visvader JE. 1987 Self-cleavage of RNA in the replication of viroids and virusoids. *J Cell Sci Suppl.* pp 303-318

Tablot, D, Ranson, M, Davies J, Lahn M, Callies S, et al., 2010 Tumor survivin is downregulated by the antisense oligonucleotide LY2181308: a proof of concept, first-in-human dose study. *Clin. Cancer Res.* 16, 6150–6158

Tedeschi L., Lande C, Cecchetti A., Citti L., 2009. Hammerhead ribozyme in therapeutic target discovery and validation. *Drug Discovery Today*, pp 14(15-16):776-783.

Tibes R, McDonagh KT, Lekakis L, Bogenberger JM, Kim S, et al., 2015, Phase I study of the novel Cdc2/CDK1 and AKT inhibitor terameprocol in patients with advanced leukemias. *Invest New Drugs* pp 389-396

Uhlembeck O.C. 1987. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, pp 328:596-600

Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, et al., 2015 Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* pp 16, 375-384

Weiss, A. et al. 2012 Survivin inhibition by an interacting recombinant peptide, derived from the human ferritin heavy chain, impedes tumor cell growth. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 1205–1220

Weng DE, Masci PA, Radka SF, Jackson TE, Weiss PA, et al., 2005 A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* pp 948-955

## Bibliografia

Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, et al. Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:1294–1298

WorldHealthOrganization.int.Aviable:[<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index2.html>] Accessed January 22, 2016

Yamanaka K et al., 2011. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res.* pp 17, 5423-5431

Yamauchi T, Nakamura N, Hiramoto M, Yuri M, Yokota H, et al., 2012. Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54 (nrb) complex, which is required for survivin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 425: 711-716.

Ye Q., Cai W., et al., 2014 ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene* pp 1828-1839

Zhang Y.C., Taylor M.M., Samson W.K., Phillips M.I., 2005, Antisense Inhibition, *Methods in Molecular Medicine, Vol. 106: Antisense Therapeutics, Second Edition*

### Indice delle figure

**Figura 1** Struttura tridimensionale della Survivina  
(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1e31>)

**Figura 2** Principali funzioni della Survivina (Grossman & McKenzie, 2012)

**Figura 1** Modulazione dell'apoptosi da parte delle IAP (Altieri DC, 2001)

**Figura 2** Funzione della survivina nel processo mitotico (Mita et al., 2008)

**Figura 5** Rappresentazione schematica della struttura primaria di un ribozima hammerhead

**Figura 6** Meccanismo di azione di un ribozima hammerhead

**Figura 7** Meccanismo di azione di siRNA (Siomi H et al., 2009)

**Figura 8** Struttura della pelle e localizzazione dei melanociti  
(<http://training.seer.cancer.gov/melanoma/anatomy/layers.html>)

**Figura 9** Cellule A375 a basso ed alto tasso di crescita

**Figura 10** Schema del processo di trasfezione con lipofectamina

**Figura 11.** Rappresentazione schematica della sequenza oligonucleotidica e della struttura secondaria del ribozima diretto contro BIRC5, allineato con la sequenza dello stesso BIRC5. In arancione sono mostrate sul target i tre nucleotidi UUU del sito di cleavage; sul ribozima possiamo riconoscere in rosso il dominio di legame (che porta alla formazione, insieme al target, dello Stem I e dello Stem II), in verde il core catalitico e in azzurro lo stem loop II.

**Figura 12** Camera di Burkner; Struttura della camera di Burkner

**Figura 13** Schema della procedura per l'estrazione dell' RNA (RNeasy MiniKit)

**Figura 14** Retta di taratura con  $\gamma$  globulina

**Figura 15** Schema SDS-PAGE

**Figura 16** Componenti del sandwich e camera di trasferimento

**Figura 17** Rappresentazione del trattamento della nitrocellulosa con anticorpo primario e secondario.

**Figura 18** Cellule di melanoma A375 trattate con siR-Scramble, Rbz BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM per 48 ore. Real time-PCR dell'espressione genica della survivina (\*\*\*  $p < 0,001$ , one-way ANOVA, Bonferroni post test)

**Figura 19** Western blotting su lisato proteico ottenuto da cellule di melanoma cutaneo A375 trattate con siR-Scramble, Rbz BIRC5, siR-BIRC5 100 nM. In alto: bande

## Indice delle figure

relative all'espressione della  $\beta$ -actina (42 KDa) e della survivina (16.5 KDa) a 48 ore. In basso: analisi densitometrica percentuale della survivina normalizzata su  $\beta$ -actina.

**Figura 20** Effetti indotti da siR-Scramble, Rbz BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM a 24,48 e 72 ore sulla vitalità delle cellule A375 attraverso saggio del rosso neutro.

**Figura 21** Saggio di formazione delle colonie in cellule di melanoma A375 trattate con Rbz BIRC5 100 nM per 10 giorni. In alto: Immagini rappresentative del saggio; in basso: Numero di colonie (\*  $P < 0,05$ , one way ANOVA, Bonferroni post test)

**Figura 22** Western blotting su lisato proteico ottenuto da cellule di melanoma cutaneo A375 trattate con siR-Scramble, Rbz BIRC5, siR-BIRC5 100 nM. In alto: bande relative all'espressione della  $\beta$ -actina (42 KDa) e della proteina p-ERK 1/2 (44/42 KDa) a 48 ore. In basso: analisi densitometrica percentuale di p-ERK 1/2 normalizzata su  $\beta$ -actina.

### Indice delle tabelle

**Tabella 1** Livelli di espressione della proteina survivina in tessuti tumorali (Kelly et al., 2011)

**Tabella 2** Strategie anti-tumorali mediate dal blocco della survivina.

**Tabella 3** Sequenze primer utilizzati in RT-PCR; F primer forward, R primer reverse

**Tabella 4** Quantità di cellule e di reagenti da utilizzare per i vari processi di trasfezione con siR-scramble, Rbz-BIRC5 e siR-BIRC5 100 nM.

**Tabella 5** Volume di tampone RLT da utilizzare in base al numero di cellule o al supporto utilizzato

**Tabella 6** Protocollo di Real-time PCR.

**Tabella 7** Quantità di reagenti per la costruzione della retta di taratura

**Tabella 8** Sostanze e relative quantità per la preparazione dei gel.

# Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Prof.ssa Nieri, la Dr.ssa Tedeschi e il Dr. Fogli per la disponibilità e la pazienza mostratemi durante la stesura di questa tesi.

Un sentito ringraziamento va alla Dr.ssa Carpi e alla Dr.ssa Polini che, attraverso i loro preziosi insegnamenti mi hanno aiutato nello sviluppo di questo lavoro e mi hanno dato un grande supporto morale permettendomi di affrontarlo in assoluta serenità.

Un grazie ai miei genitori e alla mia fidanzata che mi hanno sostenuto in questi lunghi e intensi 5 anni. Siete la mia roccaforte.

Infine, un grazie alle mie compagne di tesi Elisa e Lucia con cui ho condiviso momenti bellissimi che porterò sempre dietro.